

Aus dem Institut für Transfusionsmedizin
des Universitätsklinikums Charité der Humboldt - Universität zu Berlin
Direktor: Prof. Dr.-Ing. Dr. med. H. Kieseewetter

DISSERTATION

Thema: Durchflußzytometrische Bestimmung der zellulären Kontamination
von Frischplasma aus verschiedenen Herstellungsverfahren

zur Erlangung des Akademischen Grades
doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Frau Sabine Lindenau
geb. am 17.06.1971 in Magdeburg

Dekan: Prof. Dr. W. Sterry

Gutachter: 1. Prof. Dr. Ing. - Dr. med. H. Kieseewetter

2. Prof. Dr. med. R. Kielstein

3. Prof. Dr. med. Heim

eingereicht: Juni 1996

Datum der Promotion:

Inhaltsverzeichnis

1.	Zusammenfassung	1
2.	Einleitung	2
3.	Fragestellung	10
4.	Material und Methoden	11
4.1	Theoretische Grundlagen	11
4.1.1	Herstellungsverfahren für Frischplasma	11
	Vollblutfractionierung	12
	Plasmapherese mit Haemonetics MCS 3p	12
	Diskontinuierliche Thrombapherese mit Haemonetics MCS 3p	13
	Kontinuierliche Thrombapherese mit COBE Spectra	14
	Kontinuierliche Thrombapherese mit dem Blutzellseparator AS 104 (Fresenius)	14
4.1.2	Durchflußzytometrie	15
4.2	Praktischer Teil	18
4.2.1	Kalibrierung des Durchflußzytometers, Gating	18
4.2.2	Durchführung der Vorversuche	19
4.2.3	Präparation der Frischplasma-proben	20
4.2.4	Auswertung der Messungen, Statistik	21
5.	Ergebnisse	24
5.1	Ergebnisse der Vorversuche	24
5.1.1	Sensitivitätsbestimmung der durchflußzytometrischen Methode	24
5.1.2	Bestimmung der Präzision der durchflußzytometrischen Methode	25
5.1.3	Vergleich mit den Ergebnissen aus der Zählung in der Nageotte-Kammer	26
5.2	Ergebnisse der Hauptversuche und statistische Auswertung	27
5.2.1	Leukozyten in Frischplasma	27
5.2.2	Thrombozyten in Frischplasma	31
5.2.3	Erythrozyten in Frischplasma	33
5.2.4	Vergleich der Verfahren mit periodischer und konstanter Trenngrenze bei Fresenius AS 104	35
5.2.5	Vergleich der fünf Herstellungsverfahren für Frischplasma	35
5.3	Veränderungen der Zellzahl durch Schockgefrieren	36

6.	Diskussion	38
6.1	Eignung der Methode	38
6.2	Zelluläre Kontamination von Frischplasma	41
6.3	Ergebnisse anderer Untersucher	43
6.4	Einfluß des Einfrierens und Auftauens auf den Zellgehalt von Frischplasma	43
6.5	Schlußfolgerungen	44
7.	Literaturverzeichnis	45
8.	Danksagung	50
9.	Lebenslauf	51
10.	Selbständigkeitserklärung	53

1. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde Frischplasma aus fünf verschiedenen Herstellungsverfahren auf seinen Gehalt an Leukozyten, Thrombozyten und Erythrozyten untersucht.

Die Zellkonzentrationen wurden nach Markierung der Zellen mit fluoreszenzkonjugierten monoklonalen Antikörpern mit einem Durchflußzytometer ermittelt. Zur Bestimmung des vom Durchflußzytometer analysierten Volumens wurden kommerziell erhältliche Latex-Eichpartikel verwendet. Mit der beschriebenen Methode konnten Leukozytenkonzentrationen bis in einen Bereich von 0,5 bis 1 Leukozyten/ μ l zuverlässig bestimmt werden, wobei der Variationskoeffizient im Bereich von 0,8 Leukozyten/ μ l bei 22,9 % lag. Die Methode wies eine zufriedenstellende Korrelation zur mikroskopischen Zählung in der Nageotte-Kammer auf.

Es konnte gezeigt werden, daß sich Frischplasmen aus verschiedenen Herstellungsverfahren hinsichtlich ihrer Zellzusammensetzung signifikant voneinander unterscheiden.

Es konnte kein signifikanter Unterschied im Erythrozytengehalt der untersuchten Plasmen gefunden werden. Die gesetzlichen Vorschriften bezüglich der Erythrozytenkontamination von Frischplasma wurden von allen fünf Verfahren erfüllt.

Drei der untersuchten Verfahren überschritten den gesetzlichen Grenzwert der Thrombozytenkontamination mit 24,3 und 165 sowie 292 % erheblich, während die anderen Verfahren die gesetzlichen Voraussetzungen erfüllten und sich bezüglich des Thrombozytengehaltes nicht signifikant voneinander unterschieden.

Die leukozytäre Kontamination der untersuchten Frischplasma-Proben lag bei allen untersuchten Verfahren unterhalb des gesetzlich vorgeschriebenen Grenzwertes von 500 Leukozyten/ μ l. Allerdings konnte nur Frischplasma, das als Nebenprodukt bei kontinuierlichen Thrombaphereseverfahren gewonnen wurde, den sogenannten cill-Wert (critical immunological load of leukocytes) unterschreiten, der nach dem derzeitigen Kenntnisstand als Schwelle für die Auslösung von Alloimmunisierungen angesehen wird.

Diese Ergebnisse sollten zu Überlegungen Anlaß geben, Patienten mit einem erhöhten Risiko für eine Alloimmunisierung entweder mit gezielt nach dem Herstellungsverfahren ausgewählten Frischplasmakonserven, oder aber mit leukozytendepletierten Produkten zu versorgen.

2. Einleitung

Die Transfusion allogener Vollblutkonserven gilt heute als obsolet. An ihre Stelle ist der Einsatz von buffy-coat-armen Erythrozytenkonzentraten, Thrombozytenkonzentraten und Frischplasma getreten. Dies liegt einerseits darin begründet, daß die einzelnen Blutkomponenten unterschiedliche Lagerungsoptima aufweisen. Erythrozyten sind bei 4°C über 6 bis 7 Wochen haltbar, während Thrombozyten bei 22 bis 24°C fünf Tage und Frischplasma bei Temperaturen von unter -30°C bis zu einem Jahr haltbar sind. Allerdings verliert Frischplasma selbst bei einer Lagertemperatur von 4°C bereits nach kurzer Zeit seine Gerinnungsaktivität. Zum anderen tritt in Vollblutkonserven während der Lagerung eine wesentlich stärkere Bildung von Mikroaggregaten auf als bei Blutkomponenten. Diese Mikroaggregate, die aus Zellfragmenten, degenerierten Zellen, Membranbestandteilen und Proteinen bestehen, werden für eine Reihe von Transfusionskomplikationen, wie das Adult Respiratory Distress Syndrom (ARDS), die Thrombozytopenie post transfusionem und die Senkung des Fibronektinspiegels des Empfängers verantwortlich gemacht und sind daher in höchstem Maße unerwünscht²⁴.

Aber auch die Transfusion allogener Blutkomponenten ist mit einer ganzen Anzahl von unerwünschten Nebenwirkungen verbunden.

Der größte Teil dieser Nebenwirkungen ist an die Gegenwart von fremden Zellen gebunden und wird insbesondere den Fremdleukozyten, die kontaminierend in den verschiedenen Blutkomponenten vorhanden sind, zugeschrieben. Dazu zählen die Alloimmunisierung, immunmodulatorische Effekte beim Empfänger und die Übertragung infektiöser Agenien.

Unter Alloimmunisierung wird die Bildung von Antikörpern gegen fremde Antigen determinanten verstanden. Dabei handelt es sich vorwiegend um Antigene des MHC (major histocompatibility complex). Unter dem Begriff MHC werden die Genorte auf dem kurzen Schenkel des 6. Chromosomenpaares zusammengefaßt, die für die Ausprägung der Histokompatibilitätsantigene auf den Körperzellen kodieren. Diese Antigene wurden zuerst auf Leukozyten beschrieben und werden deshalb als HLA (human leukocyte antigens) bezeichnet. Unter den HLA wird in Klasse I- und Klasse II-Antigene unterschieden, die von verschiedenen Genorten kodiert werden und in ihrer Struktur differieren. Während alle kernhaltigen Körperzellen sowie Thrombozyten Klasse I-Antigene tragen, befinden sich auf der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen, zu denen unter anderen die B-Lymphozyten, aktivierte T-Lymphozyten und Mono-

zyten gehören, sowohl Klasse I - als auch Klasse II-Antigene. Für die Auslösung einer Alloimmunisierung ist das Vorhandensein von fremden HLA - Klasse I und Klasse II tragenden Zellen notwendig^{10,29,47,53}.

CLAAS¹⁰ et al. konnten bereits 1981 im Tiermodell zeigen, daß die Transfusion von Thrombozyten allein keine Antikörperbildung beim Empfänger hervorruft, während bei einer Kontamination der Thrombozytensuspension mit 10^3 Leukozyten pro Transfusion bei Mäusen eine Alloimmunisierung erfolgt. Sie zeigten auch, daß nach der Transfusion einer leukozytenkontaminierten Thrombozytensuspension eine stärkere Antikörperbildung zu beobachten ist als nach Gabe der äquivalenten Leukozytenmenge allein.

Eine Alloimmunisierung kann sich klinisch in nicht-hämolytischen febrilen Transfusionsreaktionen und in einer Refraktärität gegen allogene Thrombozytenkonzentrate darstellen.

Als Ursache nicht-hämolytischer febriler Transfusionsreaktionen werden die Interaktion von HLA-I-Antikörpern mit Spenderleukozyten, das Wirken von Antikörpern gegen Spendergranulozyten sowie das Vorhandensein von während der Lagerung aus Leukozyten freigesetzten Zytokinen angegeben^{24, 33}.

Ihre Häufigkeit nimmt ab, wenn weniger als $2,5 - 5 \cdot 10^8$ Leukozyten pro Transfusionseinheit übertragen werden. Dieser Grenzwert wird auch als call-Wert (critical antigenic load of leukocytes) bezeichnet^{24, 33}.

Die Refraktärität gegen allogene Thrombozyten stellt das Hauptproblem bei der Behandlung thrombozytopenischer Zustände mit Thrombozytenkonzentraten dar. Sie wird mit einer Inzidenz von 30 bis 70 % angegeben³.

SAARINEN⁴⁷ et al. verglichen 1990 die Inzidenz der Thrombozytenrefraktärität bei Verwendung von Standardblutpräparaten und leukozytenarmen Präparaten. Bei der von den Autoren untersuchten Population immunsupprimierter krebskranker Kinder entwickelte keiner der Patienten, die weniger als $1 \cdot 10^6$ Leukozyten erhalten hatten, eine Thrombozytenrefraktärität, während in der Kontrollgruppe, die mit herkömmlichen Thrombozytenkonzentraten versorgt wurde, 52 % der Patienten eine Thrombozytenrefraktärität entwickelten.

In einer Arbeit von BLAJCHMAN et al.³ lag die Refraktäritätsrate gegen Thrombozyten im Tierversuch nach 8 Wochen mit einer wöchentlichen Transfusion von herkömmlichem Thrombozytenkonzentrat bei 91,2 %. Wurde das Blut um 99,5-99,6 % leukozytendepletiert, sank sie auf 30 %.

Eine andere Folge der kontaminierenden Fremdleukozyten in allogenen Blutprodukten besteht in einer Immunsuppression des Empfängers.

Diese transfusionsinduzierte Immunsuppression zeigt sich klinisch beispielsweise in erhöhten postoperativen Infektionsraten nach der Transfusion allogener Blutprodukte^{5,25,26,46,51}. Es konnte eine Abhängigkeit vom Leukozytengehalt des Blutproduktes gezeigt werden²⁵.

JENSEN et al. zeigten in einer Studie von 1990, daß Bluttransfusionen einen wesentlichen Risikofaktor für die Ausprägung infektiöser Komplikationen in der Colorektalchirurgie darstellten²⁶.

BORDIN und BLAJCHMAN⁵ stellten in einer Übersichtsarbeit 1995 die Ergebnisse verschiedener Studien über den Zusammenhang zwischen Fremdbluttransfusionen und postoperativen bakteriellen Infektionen bei Patienten mit resektiven Eingriffen an malignen Tumoren zusammen. Die fünf von den Autoren ausgewerteten Arbeiten ergaben, daß die Inzidenz von postoperativen bakteriellen Infektionen bei mit allogenen Blut versorgten Tumorpatienten zwischen 20 und 30 % lag, während sie bei Patienten ohne Transfusion bzw. mit autologer oder syngener Transfusion zwischen 2 und 10 % lag.

TRIULZI⁵¹ et al. beschrieben eine fünffache Erhöhung der Rate an postoperativen bakteriellen Hospitalinfektionen bei Patienten mit allogenen Bluttransfusionen im Vergleich zu Patienten mit autologer oder ohne Transfusion. Die Autoren bestätigten den von anderen Untersuchern⁴⁶ gefundenen dosisabhängigen Zusammenhang zwischen der Anzahl der Transfusions-einheiten und der postoperativen Infektionsrate.

ROSEMURGY et al.⁴⁶ fanden in einer Studie an 390 Notaufnahmepatienten, daß das Infektionsrisiko, die Rate an multiplen Infektionen sowie die Schwere einer Infektion mit der Anzahl der transfundierten Erythrozytenkonzentrate anstiegen.

Diese Studien sind nicht unwidersprochen geblieben. Es scheint plausibel, daß Patienten mit einem erhöhten Bedarf an allogenen Bluttransfusionen sich a priori in einem schlechteren Allgemeinzustand befinden und daher von vornherein ein erhöhtes Risiko für Infektionen aufweisen. Allerdings ist es ethisch kaum vertretbar, zur Klärung dieser Frage randomisierte Studien durchzuführen, in deren Rahmen Patienten mit einem erhöhten Bedarf an allogenen Bluttransfusionen nicht mit solchen versorgt werden, oder Patienten mit mehr allogenen Bluttransfusionen versorgt werden, als es klinisch indiziert ist.

In einer weiteren Arbeit untersuchten JENSEN et al.²⁵ die postoperative Infektionsrate und die Funktion der natürlichen Killerzellen in Abhängigkeit vom Leukozytengehalt des transfundierten Blutpräparates. So konnten sie eine Wundsepsis bei 23 % der Patienten, die Vollbluttransfusionen erhalten hatten, bei 2 % der Patienten mit Transfusionen von leukozytendepletiertem Blut und bei 2 % der Patienten ohne Transfusion beobachten. Die Funktion der natürlichen Killerzellen war bei den Patienten mit Vollbluttransfusionen im Gegensatz zu den beiden anderen Gruppen signifikant beeinträchtigt und blieb es bis zu einem Monat.

Der immunsuppressive Effekt von Bluttransfusionen wurde auch im Zusammenhang mit erhöhten Tumorrezidivraten nach Fremdbluttransfusionen in der Tumorchirurgie untersucht.

BORDIN und BLAJCHMAN⁵ wiesen darauf hin, daß Untersuchungen über den Zusammenhang zwischen Fremdbluttransfusionen und der Wahrscheinlichkeit eines Tumorrezidivs zu meist retrospektiven Studien an Patienten mit Colorektalkarzinomen entstammen. Sie ließen die Ergebnisse von 30 Studien zu diesem Thema von zwei unabhängigen Untersuchergruppen analysieren. Beide Gruppen kamen zu dem Schluß, daß allogene Bluttransfusionen das Rezidivrisiko erhöhen und die Gesamtprognose des Patienten verschlechtern.

Sie bezogen in ihre Zusammenfassung 40 weitere Studien zu dieser Fragestellung ein, in denen andere Typen maligner Erkrankungen der Brust, Lunge, Prostata, des Magens, der Leber, des Kopf- und Halsbereiches, der Cervix, Vulva, der Knochen- und Weichgewebe und Lebermetastasen untersucht worden waren. Insgesamt bestätigten 65 % aller Studien den negativen Einfluß allogener Bluttransfusionen auf die Rezidivwahrscheinlichkeit und die Überlebenszeit des Patienten, während 35 % diesen Zusammenhang nicht finden konnten.

Die wohl am besten untersuchte klinische Konsequenz der transfusionsinduzierten Immunsuppression ist die verbesserte Transplantatüberlebenszeit bei Patienten, die vor der Organtransplantation allogene Bluttransfusionen erhalten hatten, im Vergleich zu Patienten, die entweder kein Blut oder aber Eigenblut erhalten hatten. Auch hier weisen zumindest einige der Studien^{37,38} eine Dosisabhängigkeit dieses Effektes nach.

OPELZ et al.³⁷ untersuchten zwischen 1969 und 1971 bei 148 Patienten den Zusammenhang zwischen Bluttransfusion und der Transplantatüberlebensrate nach darauffolgender Nierentransplantation. Dabei zeigten die Patienten mit mehr als zehn Transfusionen die höchste Transplantatüberlebensrate (66 % nach einem Jahr), gegenüber 43 % in der Gruppe mit einer bis zehn Transfusionen und 29 % in der Gruppe ohne Bluttransfusion.

CORRY et al.¹¹ fanden bei Patienten mit Nierentransplantaten, die nie zuvor Transfusionen erhalten hatten, eine durchschnittliche Transplantatüberlebensrate von 45 % nach einem Jahr,

während Patienten mit perioperativer und/oder präoperativer Transfusion Transplantatüberlebensraten zwischen 59 und 71 % erreichten. Damit lagen die Transplantatüberlebensraten bei den zuvor transfundierten Patienten signifikant höher als bei solchen Patienten, die nie zuvor eine Transfusion erhalten hatten.

1977 wurde in einer weiteren Studie von OPELZ et al.³⁹ an 1360 Nierentransplantationen der direkte Zusammenhang zwischen der Transplantatüberlebenszeit und der Anzahl der transfundierten Einheiten an Blut bestätigt. So lag die 4-Jahres-Überlebensrate bei Patienten ohne Transfusionen bei 30 %, im Gegensatz dazu bei Patienten mit mehr als 20 präoperativen Transfusionen bei 65 %.

Es konnte auch nachgewiesen werden, daß die Leukozyten für diesen transplantatprotektiven Effekt verantwortlich sind.

PERSIJN et al.⁴⁰ stellten 1979 im Rahmen einer retrospektiven Studie fest, daß bei Transplantatempfängern, die eine (1) präoperative Bluttransfusion erhalten hatten, die Transplantatüberlebensrate nach einem Jahr bei 87 % lag, während Empfänger, die vor der Transplantation nie transfundiert worden waren, eine Transplantatüberlebensrate von nur 32 % im selben Zeitraum erreichten.

In einer prospektiven Studie fanden sie heraus, daß sich die Transplantatüberlebensraten der Empfänger leukozytendepletierter ("leukozytenfreier") Präparate nicht signifikant von denen unterschieden, die nie zuvor eine Transfusion erhalten hatten. Die Patienten, die gewaschene ("leukozytenarme") Erythrozytenkonzentrate erhalten hatten, erreichten ähnliche Transplantatüberlebenszeiten wie diejenigen, die zuvor eine (1) herkömmliche Bluttransfusion erhalten hatten.

Desweiteren beobachtete man bei Empfängern von Fremdbluttransfusionen zum einen als Ursache, zum anderen als Folge eines geschwächten Immunsystems eine erhöhte Inzidenz von Virusinfektionen, insbesondere mit Hepatitis B-Virus (HBV), Hepatitis C-Virus (HCV), Human Immunodeficiency Virus (HIV), Cytomegalievirus (CMV), Epstein-Barr-Virus (EBV) und Human T-Cell-Leucaemia Virus I (HTLV I), und ein rascheres Fortschreiten solcher Infektionen⁶. Dabei findet man einige Viren, die durch Blutprodukte übertragen werden, sowohl in den Leukozyten als auch im Plasma, für andere jedoch werden die Leukozyten als der einzige oder der Hauptvektor bei der parenteralen Verbreitung angesehen. Das gilt für CMV, HTLV I und EBV.

Der Zusammenhang zwischen allogenen Bluttransfusionen und der Übertragung von Cytomegalievirus - Infektionen ist schon lange bekannt und durch zahlreiche Studien belegt^{13,21,43,54}.

Für die CMV-Infektion nach allogener Transfusion werden zwei Mechanismen angenommen: einerseits die direkte Übertragung von Viren, andererseits die Reaktivierung latenter CMV-Infektionen⁴³.

Für die Virusübertragung werden die Leukozyten verantwortlich gemacht^{20,43}. Aber auch bei der Reaktivierung latenter CMV-Infektionen scheint die leukozytenassoziierte Immunsuppression eine entscheidende Rolle zu spielen²³.

Verschiedene Studien belegen, daß CMV-Infektionen durch die Verwendung leukozytendepletierter Blutprodukte vermeidbar sind^{17,20,22}.

Da die Leukozytendepletierung auch das Risiko für eine Alloimmunisierung deutlich reduzieren kann^{10,47}, fand in den letzten Jahren der Grenzwert der Leukozytenkontamination, unterhalb dessen eine Alloimmunisierung nicht mehr zu erwarten ist, großes Interesse. Obwohl ein definitiver Wert noch nicht gefunden werden konnte, da er möglicherweise starken interindividuellen Schwankungen unterliegt, wurde mit dem cill-Wert (critical immunological load of leukocytes) von $1 \cdot 10^6$ Leukozyten pro Transfusionseinheit eine Richtlinie geschaffen.

Verschiedene Autoren haben sich um die Angabe von Grenzwerten bemüht. So fanden VAN MARWIJK KOOY et al.⁵³ in einer Studie, daß die Inzidenz einer Alloimmunisierung bei Patienten, die mehr als $50 \cdot 10^6$ Leukozyten pro Transfusion erhalten hatten, um 51 % höher lag als bei Patienten mit weniger als $50 \cdot 10^6$ Leukozyten pro Transfusion.

In einer Arbeit von FISHER et al.¹⁸ konnte gezeigt werden, daß eine Alloimmunisierung mit einer Leukozytendosis von weniger als $5 \cdot 10^6$ Zellen pro Transfusionseinheit verhindert werden kann.

SNIECINSKI et al.⁵⁰ fanden eine Senkung der Inzidenz von Alloimmunisierungen von 50 auf 15 %, wenn statt konventioneller Thrombozytenkonzentrate gefilterte Produkte mit einem Leukozytengehalt von durchschnittlich 610^6 Leukozyten verwendet wurden.

In einer Arbeit von OKSANEN et al.³⁶ zeigte keiner der Patienten, die gefilterte Thrombozytenkonzentrate mit einem Leukozytengehalt von weniger als $1 \cdot 10^6$ Zellen pro Transfusionseinheit erhalten hatten, eine Thrombozytenrefraktärität.

In der vorliegenden Arbeit soll Frischplasma auf seine zelluläre Kontamination untersucht werden.

Frischplasma ist gemäß der Produktmonographie des Bundesanzeigers Nr. 182 vom 27.09.1989 "weitgehend zellfrei". Es sollte weniger als 1000 Erythrozyten, weniger als 20 000 Thrombozyten und weniger als 500 Leukozyten pro μl enthalten ⁹. Dies entspricht bei einem Transfusionsvolumen von 300 ml $300 \cdot 10^6$ Erythrozyten, $6000 \cdot 10^6$ Thrombozyten und $150 \cdot 10^6$ Leukozyten pro Transfusionseinheit.

Gemäß den Empfehlungen des Council of Europe darf der Thrombozytengehalt von gefrorenem Frischplasma 25 000 Zellen pro μl nicht überschreiten ¹².

Wenn nun, wie oben beschrieben, ein kritischer Grenzwert der Leukozytenkontamination für die Alloimmunisierung und die Übertragung infektiöser Agentien durch Blutprodukte angenommen werden kann, stellt sich die Frage, ob das als "nahezu zellfrei" deklarierte Frischplasma tatsächlich einen unterhalb dieses Wertes gelegenen Zellgehalt, insbesondere an Leukozyten, aufweist und ob sich die verschiedenen Herstellungsverfahren hinsichtlich der zellulären Kontamination des gewonnenen Frischplasmas unterscheiden.

Für die Quantifizierung von sehr kleinen Zellzahlen, wie sie im Frischplasma erwartet werden, sind herkömmliche Methoden, wie die Verwendung von Blutbildautomaten oder Standardzählkammern, nicht geeignet. Blutbildautomaten können Leukozytenkonzentrationen unter 50-100/ μl und Thrombozytenkonzentrationen unter 3500-4000/ μl nicht mehr ausreichend genau quantifizieren ^{19,55}. Mit der Entwicklung moderner Leukozytenfilter konnte die Leukozytenkontamination in Erythrozyten- und Thrombozytenkonzentraten um bis zu 4 Zehnerpotenzen - das entspricht einem Restleukozytengehalt in der Größenordnung von $1 \cdot 10^5$ Leukozyten pro Transfusionseinheit und weniger als einem Leukozyten pro μl - gesenkt werden.

Da die Quantifizierung sehr kleiner Leukozytenzahlen in Blutprodukten sowohl im Rahmen der Qualitätskontrolle als auch bei der Weiterentwicklung der Leukozytenfilter von zunehmender Bedeutung ist, sind in den letzten Jahren verschiedene Methoden zur Ermittlung kleiner Leukozytenkonzentrationen in Blutprodukten beschrieben worden. Dazu gehören die Anwendung der Fluoreszenzmikroskopie ^{14,27}, der Durchflußzytometrie ^{1,4,16,45,49,52,56} sowie die Verwendung großvolumiger Zählkammern wie der Nageotte-Kammer ^{31,32,35,42}. Von WESTER et al. ⁵⁷ wurde 1990 eine Radioimmunoassay-Technik unter Verwendung monoklonaler Antikörper ange-

geben. LEE et al.³⁰ beschrieben 1994 auch die Anwendung der polymerase-chain-reaction (PCR) zur Vermehrung leukozytärer HLA-DNA, um eine quantitative Aussage über den Leukozytengehalt gefilterter Blutprodukte zu ermöglichen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Restzellgehalt in Frischplasma unter Verwendung eines Durchflußzytometers bestimmt. Um eine Konzentration der Zellen angeben zu können, muß das während des Meßvorganges prozessierte Volumen bestimmt werden, da die Flußrate des Durchflußzytometers nicht mit ausreichender Genauigkeit angegeben werden kann. Zu diesem Zweck sind verschiedene Methoden beschrieben worden. Eine Möglichkeit ist das Auswiegen der Probe vor und nach der Messung¹⁶. AL et al.¹ haben den Volumenstrom mit einer Eichlösung bestimmt, die Messung nach einer festgelegten Ereigniszahl beendet, die hierfür benötigte Zeit erfaßt und aus diesen Parametern das prozessierte Volumen errechnet. Alternativ ist die Analysierung des gesamten Probevolumens beschrieben worden⁵⁶, diese Methode birgt allerdings die Gefahr in sich, daß Luftblasen in den Meßraum aspiriert werden und die entstehenden Artefakte das Meßergebnis nachteilig beeinflussen. VACHULA⁵² und SHECKLER⁴⁹ beschrieben 1993 die Verwendung von fluoreszenzmarkierten Hühnererythrozyten als Eichpartikel. Sie stellten eine Eichlösung mit bekannter Konzentration an Partikeln her, die der Probe zugegeben wurde, und errechneten aus der vom Durchflußzytometer erfaßten Anzahl der Partikel das analysierte Volumen. Bei der in dieser Arbeit verwendeten durchflußzytometrischen Methode wurden zur Volumenbestimmung kommerziell verfügbare, standardisierte Latexeichpartikel (beads) in bekannter Konzentration verwendet.

Zur zellulären Kontamination von Frischplasma liegen bisher nur wenige Arbeiten vor, deren Ergebnisse sehr unterschiedlich sind.^{2,28,34,58} Die Ursachen hierfür mögen zum einen in den verschiedenen Herstellungsverfahren der untersuchten Plasmen, zum anderen aber auch in den verschiedenen verwendeten Untersuchungsmethoden liegen.

3. Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit soll die zelluläre Kontamination von Frischplasma aus verschiedenen Herstellungsverfahren (Vollblutfraktionierung, Plasmapherese sowie kontinuierliche und diskontinuierliche Thrombaphereseverfahren) bestimmt werden.

Die Konzentrationen von Leukozyten, Thrombozyten und Erythrozyten in Frischplasma sollen mit Hilfe eines Durchflußzytometers unter Verwendung monoklonaler Antikörper und kommerziell erhältlicher Eichpartikel ermittelt werden.

Zunächst soll die verwendete durchflußzytometrische Methode auf ihre Sensitivität geprüft werden, die Präzision der Methode soll festgestellt und mit der Zählung in der Nageotte-Kammer verglichen werden.

Es gilt herauszufinden, ob sich die verschiedenen Herstellungsverfahren für Frischplasma hinsichtlich des Zellgehaltes des hergestellten Plasmas signifikant voneinander unterscheiden und inwieweit die gesetzlichen Anforderungen an das Plasma erfüllt werden.

4. Material und Methoden

Frischplasma aus fünf verschiedenen Herstellungsverfahren wurde auf seinen Gehalt an Leukozyten, Thrombozyten und Erythrozyten unter Verwendung eines Durchflußzytometers und kommerziell erhältlicher Eichpartikel untersucht.

4.1 Theoretische Grundlagen

4.1.1 Herstellungsverfahren für Frischplasma

Frischplasma kann auf verschiedene Weise gewonnen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden fünf verschiedene Herstellungsverfahren für Frischplasma im Hinblick auf die zelluläre Kontamination des hergestellten Plasmas untersucht. Bei diesen Verfahren handelte es sich um die Separation von Frischplasma aus Vollblut ($n = 53$), die Gewinnung durch maschinelle Plasmapherese mit dem Mobile Collection System (MCS 3p) der Firma Haemonetics ($n = 50$) und die simultane Gewinnung von Frischplasma bei drei verschiedenen maschinellen Thrombaphereseverfahren.

Unter den Thrombaphereseverfahren wird zwischen kontinuierlichen und diskontinuierlichen Verfahren unterschieden. Bei den kontinuierlichen Verfahren wird das entnommene Vollblut fortlaufend der Separation zugeführt, es erfolgt eine kontinuierliche Trennung der Blutkomponenten, wobei die Trenngrenze während der gesamten Separationsdauer aufrechterhalten wird. Die nicht benötigten Separationsprodukte werden in der Regel über einen zweiten Zugang fortlaufend reinfundiert. Zu diesen Verfahren gehören die kontinuierliche Thrombapherese mit COBE Spectra ($n = 25$) und die kontinuierliche Thrombapherese mit dem Blutzellseparator AS 104 von Fresenius ($n = 26$). Bei den diskontinuierlichen Thrombaphereseverfahren läuft die Separation zyklisch ab. Vollblut wird entnommen, antikoaguliert, separiert, und die nicht benötigten Komponenten werden dem Spender reinfundiert. Dieser Zyklus wiederholt sich mehrfach, die Trenngrenze wird in jedem Zyklus neu aufgebaut. Als Vertreter dieser Verfahren wurde die diskontinuierliche Thrombapherese mit dem Mobile Collection System (MCS 3p) von Haemonetics ($n = 50$) untersucht.

Vollblutfraktionierung

450 ml Vollblut des Spenders wurden in einem Beutel-Set Art. Nr. T 2706 (Biotrans) gesammelt, bei 4000 U/min für 10 min zentrifugiert (Roto Silenta / RP, Fa. Hettich), und das Plasma wurde mit dem Biotrans Separator abgepreßt. Hierbei werden mit Hilfe einer mit Motorkraft betriebenen Andruckplatte das Plasma und die Erythrozyten aus dem Vollblutbeutel nach oben beziehungsweise unten in die für die jeweilige Komponente vorgesehenen Beutel befördert. Zwei optische Detektoren steuern den Abfluß des Plasmas und stoppen ihn, sobald Erythrozyten im Schlauch zu erscheinen beginnen. Im Vollblutbeutel verbleibt ein buffy-coat-Restvolumen von 40 ml. Das Plasma wurde gewogen und ein Schlauchsegment für die Bestimmung der zellulären Kontamination abgeschweißt. Die Umrechnung von Masse in Volumen erfolgte über die Dichte des Plasmas von 1,027 g/cm³.

Plasmapherese mit Haemonetics MCS 3p

Es wurden die Software E1, das PPP-Protokoll (platelet poor plasma, d.h. thrombozytenarmes Plasma), spezielle Zentrifugenkammern für die Plasmapherese (plasma apheresis bowl, List no. 625 B) und das Sammelbeutelset Art.Nr. P 4161 verwendet.

Bei der maschinellen Plasmapherese mit dem Mobile Collection System (MCS) der Firma Haemonetics wird eine Spendervene punktiert, und das entnommene Vollblut wird automatisch in einem definierten Verhältnis mit 4 %iger Natriumcitratlösung als Antikoagulans gemischt. In drei Zyklen wird das Blut in die Zentrifugenkammer geleitet und bei 6000 U/min separiert. Die Zellen ordnen sich aufgrund der Zentrifugalkräfte in vertikalen Schichten abnehmender Dichte von außen nach innen in der Reihenfolge Erythrozyten - Granulozyten - Monozyten - Lymphozyten - Thrombozyten - Plasma in der rotierenden Zentrifugenkammer an. Das Plasma befindet sich in der Mitte der Glocke, von wo es in den Sammelbeutel abfließt. Der Plasmaüberlauf wird beendet, wenn entweder die Waage die vorgegebene Menge an Plasma pro Zyklus erreicht oder der Überlaufsensor Thrombozyten im Ablaufschlauch erkennt. Dann schließt sich das Plasmaventil, um eine zelluläre Kontamination des Plasmas zu verhindern, und die Zentrifuge bremst. Anschließend erhält der Spender die nicht benötigten Komponenten zurück. Dieser Ablauf wiederholt sich insgesamt dreimal.

Das gewonnene Plasma wurde gewogen und ein Schlauchsegment wurde zur Untersuchung abgeschweißt. Die Umrechnung von Masse in Volumen erfolgte über die Dichte des Plasmas von $1,027 \text{ g/cm}^3$.

Diskontinuierliche Thrombapherese mit Haemonetics MCS 3p

Es wurden die Software E1, das PLP-Protokoll (platelets and plasma) und das Beutelset Art. Nr. 790 F verwendet.

Dem Spender wird nach Punktion einer Vene in mehreren Zyklen Vollblut entnommen und durch Zentrifugation in seine Bestandteile aufgetrennt. Dem Spender werden die in Plasma resuspendierten Erythrozyten zyklisch zurückgegeben.

Insgesamt läuft dieser Zyklus sechsmal pro Spende ab. Neben einem Thrombozytenkonzentrat wird hier auch eine Transfusionseinheit Frischplasma gewonnen.

Die Separation erfolgt in der Latham-Glocke. In der Entnahmephase wird antikoaguliertes Blut von oben in die Glocke geleitet und fließt durch einen Kanal zum Glockenboden. Bei einer Zentrifugationsgeschwindigkeit von 4800 U/min ordnen sich die Blutkomponenten infolge der Zentrifugalkräfte von außen nach innen entsprechend ihrer Dichte in der rotierenden Glocke an. Als erstes fließt das in der Mitte befindliche Plasma durch die Ablauföffnung in den Plasmabeutel ab, bis die eingebaute Glockenoptik den buffy coat erkennt. Jetzt schließen sich die Spenderventile, das sogenannte surge-Ventil öffnet sich und läßt Plasma zurück in die Glocke gelangen, wo es zum äußeren Rand des Glockenbodens geleitet wird, anschließend die separierten Zellschichten durchläuft und damit deren Separationsgrad erhöht. Jetzt wird das Plasma erneut gesammelt. Die Rezirkulation von Plasma dauert an, bis der Sensor des Ablaufschlauches Thrombozyten erkennt. Dann wird das Ventil zum Thrombozytenbeutel geöffnet, und die Thrombozyten werden in den Sammelbeutel geleitet. Ist der Sammelvorgang beendet, stoppt die Zentrifuge, und die in der Glocke verbliebenen Bestandteile vermischen sich aufgrund der nachlassenden Zentrifugalkraft wieder miteinander. Beim Beginn des Rückgabezyklus ist das Thrombozytenventil geöffnet, und die restlichen im Ablaufschlauch verbliebenen zellulären Elemente werden zurück in die Glocke gesogen, um zu verhindern, daß im nächsten Entnahmezyklus Erythrozyten in den Plasmabeutel gelangen. Dem Spender werden die Erythrozyten reinfundiert.

Das Untersuchungsmaterial wurde durch Abschweißen eines Segmentes aus dem Zufuhrschlauch zum Plasmasammelbeutel unmittelbar nach Beendigung des Verfahrens gewonnen, und das von der Maschine angegebene Volumen des gewonnenen Plasmas wurde erfaßt.

Kontinuierliche Thrombapherese mit COBE Spectra

Es wurden mit dem COBE Spectra Apheresesystem Thrombozytenkonzentrate im Zweinadel-Verfahren mit simultaner Gewinnung einer Transfusionseinheit Frischplasma hergestellt. Dabei wurden Zweinadel-Langzeitthrombozyten-(ELPTM)-Blutschlauchsets, Katalog-Nr.777 003.000 bzw. 000 777. 020 verwendet.

Es handelt sich um ein kontinuierliches Aphereseverfahren. Zwei Venen des Spenders werden punktiert, unter fortlaufender Entnahme von Vollblut und Rückgabe der nicht gesammelten Blutkomponenten erfolgt die Auftrennung bei einer Zentrifugationsgeschwindigkeit von 2400 U/min. Die Zentrifugenkammer wird beim COBE Spectra Apheresesystem als Zweiphasen-Thrombozytenkanal bezeichnet. Antikoaguliertes Vollblut wird in den in der Aufsicht oval gestalteten Kanal eingeleitet. In der ersten Phase werden Erythrozyten und Leukozyten vom plättchenreichen Plasma getrennt, die Erythrozyten und Leukozyten verlassen den Kanal, das plättchenreiche Plasma tritt über einen Damm in den zweiten Abschnitt des Kanals ein. In der zweiten Phase werden die Thrombozyten konzentriert und über den Sammelschlauch abgeleitet. Das verbleibende Plasma gelangt in den Plasmasammelbeutel.

Für die weiteren Untersuchungen wurde ein Segment aus dem Zuleitungsschlauch zum Plasmasammelbeutel abgeschweißt, und das Volumen des gewonnenen Plasmas wurde erfaßt.

Kontinuierliche Thrombapherese mit dem Blutzellseparator AS 104 der Firma Fresenius

Es wurden Thrombapheresen mit simultaner Gewinnung einer Transfusionseinheit Frischplasma unter Verwendung des C4L Thrombozytapherese-Sets, Art.Nr. 9007271 durchgeführt.

Der Blutzellseparator AS 104 arbeitet mit kontinuierlichen Flüssen, das heißt, dem Spender wird nach Punktion zweier Venen kontinuierlich Blut entnommen, mit Antikoagulanzen versetzt und in der Zentrifuge bei 2000 U/min aufgetrennt. Dabei ordnen sich die Blutkomponenten von außen nach innen entsprechend ihrer Größe und Dichte in der Zentrifugenkammer an. Die Zentrifugenkammer besitzt verschiedene Abflußkanäle, die eine Ableitung der Komponenten ermöglichen. Bis auf die gewünschten Anteile werden die Blutkomponenten in einer Tropfkammer gemischt und zum Spender zurückgeführt.

Beim Blutzellseparator AS 104 ist die Zentrifugenkammer exzentrisch konstruiert und für eine zweistufige Separation ausgelegt. Vollblut wird zugeführt und zunächst in plättchenreiches Plasma und Erythrozyten mit Leukozyten getrennt. Im zweiten Separationsschritt werden Thrombozyten und plättchenarmes Plasma getrennt. Die Lage der Trenngrenze wird optoelek-

tronisch geregelt. Die Separationskammer verfügt über ein Fenster, durch das die Grenze zwischen dem Plasma und den Blutzellen erkannt werden kann. In diesem Fenster befindet sich eine Lochreihe. Im Boden der Separationskammer ist eine Lichtquelle angebracht, deren Lichtsignale von einem senkrecht über der Separationskammer befindlichen Detektor empfangen werden. Dieser Detektor ermittelt die Anzahl der für ihn sichtbaren Löcher. Sichtbar ist ein Loch für ihn nur dann, wenn Plasma darüber steht und es sich als heller Fleck darstellt. Stehen Zellen darüber, kann der Detektor das Loch nicht als solches erkennen. Bei der Voreinstellung des Zellseparators wird festgelegt, wie breit die Erythrozytenschicht in der Kammer sein soll, wieviele Löcher der Detektor also erkennen soll. Die tatsächliche Breite des Zellstandes wird ständig mit der Vorgabe verglichen. Sind zuwenig Löcher zu sehen, bleibt die Plasmapumpe stehen, bis sich genügend Plasma angesammelt hat, um die Trenngrenze zu verschieben.

Neben dieser Betriebsart mit konstanter Trenngrenze ($n = 14$) wurde auch Plasma aus dem Betrieb mit periodischer Trenngrenze untersucht ($n = 12$). Beim Betrieb mit periodischer Trenngrenze wird während der Sammelphase die Position der Phasengrenze Erythrozyten/Plasma weiter außen fixiert, wodurch eine breitere Plasmaschicht entsteht. Während der Transferphase wird die Plasmaschicht in vorgegebenen Zeitintervallen verschmälert, um die Thrombozytenausbeute zu erhöhen. Diese beiden Phasen wiederholen sich zyklisch.

Bei der Anwendung der periodischen Trenngrenze wird die leukozytäre Kontamination des Thrombozytenkonzentrates deutlich vermindert.

Das Probenmaterial wurde durch Abschweißen eines Schlauchsegmentes aus dem Zufuhrschlauch zum Plasmasammelbeutel gewonnen. Das gewonnene Plasmavolumen der Spende wurde erfaßt.

4.1.2 Durchflußzytometrie

Die Durchflußzytometrie ist eine Methode zur Analyse der Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften von Einzelzellen in Suspension. Dabei können die Zellen mittels spezifischer, fluoreszenzmarkierter monoklonaler Antikörper anhand ihrer Oberflächenantigene charakterisiert werden, was eine Unterscheidung von Zellen mit ähnlichen morphologischen Eigenschaften ermöglicht.

Die zu untersuchende Zellsuspension wird über eine Kapillare mit Überdruck in den Meßbereich befördert, wobei das eigentliche Probenmaterial zur Gewährleistung eines kontinuierli-

chen Flusses von einem Mantelstrom isotoner Pufferlösung (sheath fluid) umgeben ist. Dieser Druck beschleunigt die Zellen beim Eintreffen am Analysepunkt derartig, daß sie in der Suspension einzeln und perlenkettenartig aneinandergereiht vorliegen. Zellaggregate werden durch diesen Vorgang, der auch als hydrodynamische Fokussierung bezeichnet wird, aufgelöst.

Am Analysenpunkt trifft monochromatisches Licht einer Wellenlänge von 488 nm, das mittels eines fokussierten Argonlaserstrahls generiert wird, auf die Einzelzelle.

Jede Zellart streut entsprechend ihrer Größe, der Struktur ihrer Zellmembran und der Art ihrer intrazellulären Bestandteile das auftreffende Licht in spezifischer Weise. Der größte Anteil des Lichtes wird vorwärts gestreut, wobei das Vorwärtsstreulicht (forward light scatter, FSC) nach Ausblendung des ungebrochenen Zentralstrahles ein Maß für die Größe der Zelle darstellt.

Ein weiterer Teil des Lichtes wird im rechten Winkel zum einfallenden Lichtstrahl gestreut und als Seitwärtsstreulicht (sideward light scatter, SSC, 90°-Streulicht) bezeichnet. Das Maß der Seitwärtsstreuung ist von der Granularität der Zelle abhängig.

Die zu bestimmenden Zellen können mit monoklonalen Antikörpern markiert werden, die ihrerseits mit Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert sind. Bei den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Antikörpern handelte es sich um die Fluoreszenzfarbstoffe Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE). Diese Farbstoffe werden durch das vom Laser generierte Licht mit der Wellenlänge 488 nm zur Fluoreszenz angeregt und emittieren daraufhin Licht unterschiedlicher Wellenlängen. Das Fluoreszenzspektrum von FITC weist ein Maximum bei 515 nm (gelb-grün), das von Phycoerythrin ein Maximum bei 580 nm (rot-orange) auf. Damit sind die Gipfel der Emissionsmaxima deutlich voneinander zu unterscheiden und können von entsprechenden Detektoren erfaßt werden.

Über Spiegel- und Filtersysteme werden die von jeder einzelnen Zelle ausgesandten Fluoreszenz- und Streulichtsignale auf Photoverstärkerröhren geleitet. Diese Signale werden von Detektoren erfaßt. Es wird die Amplitude des Pulses bestimmt und zur quantitativen Auswertung auf den angeschlossenen Computer übertragen.

Dabei können pro Zelle fünf Einzelparameter simultan erfaßt werden :

Vorwärtsstreulicht (FSC, forward light scatter),

Seitwärtsstreulicht (SSC, sideward light scatter, 90°-Streulicht)

Fluoreszenzsignal 1 (FITC)

Fluoreszenzsignal 2 (Phycoerythrin)

Fluoreszenzsignal 3 (hier nicht verwendet)

Für jeden dieser Parameter ist der Meßbereich in eine definierte Anzahl von Kanälen (hier 1024) eingeteilt, denen der jeweilige Puls entsprechend seiner Intensität zugeordnet wird.

Zur Leukozytenbestimmung wurde ein Antikörpermischung aus Anti-CD45-FITC und Anti-CD14-PE (Simultest™ LeucoGATE™ CD45/CD14 [Anti-HLe1/-Leu™- M3], Fa. Becton Dickinson) verwendet. Anti-CD45 bindet an ein auf allen Leukozyten in unterschiedlicher Dichte vorhandenes Antigen und ist mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) konjugiert. Anti-CD14 bindet spezifisch an Monozyten und ist mit Phycoerythrin (PE) konjugiert. Es reagiert nach Herstellerangaben auch schwach mit Granulozyten.

Zur Bestimmung der Erythrozyten- und Thrombozytenkonzentration wurden Anti-CD42a-FITC (Becton Dickinson) und Glycophorin A-PE (Firma Immunotech) verwendet. Anti-CD 42a bindet an Thrombozyten und ist mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) konjugiert, Glycophorin A bindet an Erythrozyten und ist mit Phycoerythrin (PE) konjugiert.

Um eine quantitative Aussage über den Zellgehalt einer Probe machen zu können, wurde eine Referenzpopulation beigefügt, die es ermöglicht, das prozessierte Volumen zu bestimmen. Hierzu wurden FACSCount™ control - Eichpartikel (Beads) der Firma Becton Dickinson Immunocytometry Systems in der Konzentration "medium" (230-260 Partikel pro µl) verwendet. Es handelt sich hierbei um Latexpartikel, die eine Vorwärtsstreuung wie Thrombozyten, eine Seitwärtsstreuung wie Monozyten und sehr hohe Fluoreszenzsignale aufweisen, so daß sie von jeder Zellpopulation und von den Zelltrümmern zu differenzieren sind.

Die Konzentration der Zielpopulation errechnet sich nach folgender Formel:

(vgl. RADTKE et al. ⁴⁴)

$$C_{\text{Zielpopulation}} = \frac{E_{\text{Zielpopulation}} \cdot V_{\text{Eichpartikel}} \cdot C_{\text{Eichpartikel}}}{E_{\text{Eichpartikel}} \cdot V_{\text{Zielpopulation}}}$$

C = Partikelkonzentration

E = Anzahl der vom Durchflußzytometer erfaßten Ereignisse in der entsprechenden Population

V_{Zielpopulation} = Probenvolumen

V_{Eichpartikel} = Volumen der Lösung mit den Eichpartikeln

Da gleiche Volumina (je 100 µl) an Probenlösung und FACSCount™ control-Lösung pipettiert wurden, vereinfacht sich die Formel in folgender Weise:

$$C_{\text{Zielpopulation}} = \frac{E_{\text{Zielpopulation}} \cdot C_{\text{Eichpartikel}}}{E_{\text{Eichpartikel}}}$$

Die durch die Zugabe von Formaldehydlösung zum Plasma entstandene Volumenänderung der Proben wurde rechnerisch berücksichtigt.

4.2 Praktischer Teil

4.2.1 Kalibrierung des Durchflußzytometers, Gating

In der vorliegenden Arbeit wurde als Durchflußzytometer das FACScan™ -Gerät (Becton Dickinson) in Verbindung mit einem Apple Macintosh Quadra 650 verwendet.

Die Grundeinstellung des Zytometers wurde mittels CaliBRITE™ Beads der Firma Becton Dickinson und der FACScmp-Software vorgenommen. Sie wurde allerdings dahingehend modifiziert, daß der Schwellenwert nicht anhand des Parameters Vorwärtsstreuung (FSC), sondern anhand der Seitwärtsstreuung (SSC) festgelegt wurde, um zu vermeiden, daß die Eichpartikel aufgrund ihrer kleinen Vorwärtsstreuung "abgeschnitten", das heißt von der Erfassung ausgeschlossen werden.

Zur Datenerfassung wurde die Software CELLquest™ genutzt.

Dabei wurden bereits bei der Messung durch Acquisition gates (live gates) Ereignisse in bestimmten Parameterbereichen, deren Inhalt für die betreffende Messung nicht von Interesse war, von der Erfassung ausgeschlossen. Da jede Messung nach der Erfassung einer definierten Anzahl von Ereignissen beendet wird, und nicht nur jede Zelle, sondern auch jedes Debris-Partikel ein Ereignis darstellt, hat das Ausschließen von Parameterbereichen während der Messung den Vorteil, daß mehr Zellen oder Partikel der untersuchten Populationen erfaßt werden können. Dies ist insofern bedeutungsvoll, als die Berechnung der Zellkonzentrationen über die Anzahl der erfaßten Referenzpartikel (beads) erfolgt, denn es konnte festgestellt werden, daß bei Proben mit einem hohen Gehalt an Debris die Zahl der erfaßten Referenzpartikel zu klein wird, als daß noch akzeptable Berechnungen der Zielpopulation zu erwarten sind.

Deshalb wurden bei der Erfassung der Leukozyten alle Ereignisse, die einen sehr kleinen FSC und SSC-Wert lieferten (Thrombozyten, Erythrozyten, Zelltrümmer) von vornherein nicht einbezogen, indem alle Ereignisse mit einem FSC-Signal < Kanal 60 und einem SSC-Signal < Kanal 28 von der Messung ausgeschlossen wurden.

Zur Messung der Erythrozyten- und Thrombozytenkonzentration wurden logarithmische Skaleneinteilungen für die Vorwärtsstreuung (FSC) und die Seitwärtsstreuung (SSC) gewählt. Alle Ereignisse mit einem FSC-Signal < Kanal 52 wurden von der Messung ausgeschlossen.

Bei der Thrombozytenbestimmung wurden in der Regel 10 000 Ereignisse in die Erfassung einbezogen. Handelte es sich um stark mit Zelltrümmern verunreinigte Proben, wurden bis zu 30 000 Ereignisse einbezogen, um zu gewährleisten, daß eine genügende Anzahl von Referenzpartikeln erfaßt wurde. Bei den Proben zur Leukozyten- und Erythrozytenbestimmung wurden nur 3000 bis 5000 Ereignisse einbezogen, die durchschnittliche Meßzeit lag infolge der geringen Zellkonzentrationen zwischen drei und fünf Minuten. Von längeren Meßzeiten wurde abgesehen, da zum einen das vorhandene Probenvolumen begrenzt war und zum anderen Sedimentationsphänomene vermieden werden sollten.

Es wurde für jede zu untersuchende Zellart eine Doppelbestimmung durchgeführt und der Mittelwert der beiden Messungen in der Auswertung verwendet.

4.2.2 Durchführung der Vorversuche

Zur Validierung der beschriebenen Methode bei niedrigen Leukozytenzahlen wurden Verdünnungsreihen durchgeführt. Vollblut wurde 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10 000 und 1:20 000 mit isotonem Phosphatpuffer ohne Calcium und Magnesium verdünnt. Das Blut aus jedem Verdünnungsschritt wurde wie folgt präpariert: 100 µl Vollblut bzw. verdünntes Vollblut wurden mit 100 µl FACSCount Controls™ (beads) und 10 µl Antikörper Anti-CD45-FITC/Anti-CD14-PE (Simultest™-Leukogate™, Becton Dickinson Immunocytometry Systems versetzt). Sowohl die Eichpartikel als auch das Reagenzglas mit dem Probengemisch wurden intensiv mit Hilfe eines Vortex-Gerätes (Reax 2000, Fa. Heidolph) gemischt, da sich die Latexpartikel als äußerst adhärent an den Wänden der Kunststoffgefäße erwiesen haben. Die Probe wurde für 20 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 1,5 ml Ortho-mune Lysing Reagent™ (Ortho Diagnostic Systems, Neckargemünd, Deutschland) zur Lysierung der Erythrozyten hinzugefügt, und die Probe wurde für weitere 10 min inkubiert. Die Leukozyten-

konzentration im Vollblut und für jeden Verdünnungsschritt wurde innerhalb der nächsten zehn Minuten ohne einen Zentrifugationsschritt nach erneutem Mischen mit dem Vortex-Gerät mit dem Durchflußzytometer bestimmt.

Um die Präzision der Messungen mit dem Durchflußzytometer einschließlich der vorhergehenden Präparationsschritte zu bestimmen, wurde Frischplasma aus ein und derselben Spende zehnmal wie unter 4.2.3 beschrieben präpariert und die Leukozytenzahl mit dem Durchflußzytometer bestimmt.

Desweiteren wurde ein Vergleich der durchflußzytometrischen Leukozytenbestimmung mit der mikroskopischen Zellzählung in der Nageotte-Kammer (COBE BCT Nageotte Modified Bright-Line Counting Chamber) durchgeführt. Für die Zählung in der Nageotte-Kammer wurde die Probe 1:10 mit 1%iger Peressigsäure verdünnt, gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Probe erneut gemischt, die Kammer wurde beschickt und vor der Zählung für 20 min zum Absetzen der Zellen in einer feuchten Kammer aufbewahrt. Es wurde eine Kammerhälfte mit einem Volumen von 50 µl unter dem Mikroskop ausgezählt.

4.2.3 Präparation der Frischplasma-Proben

450 µl Plasma wurden mit 50 µl 10%iger gepufferter Formaldehydlösung (Sol. Formaldehyd. 270,0 g, Dinatriumphosphat x 12 H₂O 16,4 g, Natriumdihydrogenphosphat x H₂O 4,0 g , Aqua ad 1000 g) versetzt, um eine Fixierung der Zellen zu erreichen. Aus diesem Gemisch wurden jeweils ein Ansatz zur Bestimmung des Leukozytengehaltes und ein Ansatz zur Ermittlung der Thrombozyten- und Erythrozytenkontamination hergestellt.

Es wurden je zweimal 100 µl des fixierten Plasmas mit 100 µl FACScout™-Controls-Lösung (Becton Dickinson) versetzt.

Dem Ansatz zur Leukozytenbestimmung wurden 10 µl eines Antikörpergemisches aus Anti-CD45-FITC und Anti-CD14-PE (Simultest™ LeucoGATE™ CD45/CD14 [Anti-HLe1/-Leu™-M3], Fa. Becton Dickinson) zugesetzt.

Dem Ansatz zur Erythrozyten- und Thrombozytenbestimmung wurden 10 µl Anti-CD42a-FITC (Becton Dickenson) und 10 µl Glycophorin A-PE (Firma Immunotech) zugegeben.

Anschließend wurden die Proben mittels eines Vortex-Gerätes (Reax 2000, Fa. Heidolph) gemischt.

Nach einer Inkubationszeit von 15 min, in der die Proben zur Vermeidung des Zerfalls der Fluoreszenzfarbstoffe in dunkler Umgebung bei Raumtemperatur aufbewahrt wurden, erfolgte die Verdünnung mit 500 µl einer 150 mmol PBS (phosphate-buffered saline) - Lösung ohne Calcium und Magnesium (PBS-Stammlösung 100 ml, NaCl-Stammlösung 150 ml, Aqua ad injectionem ad 1000 ml).

Anschließend wurde die Probe erneut intensiv mit dem Vortex-Gerät (Reax 2000, Fa. Heidolph) gemischt.

Dann erfolgte eine zweifache Messung mit dem Durchflußzytometer FACScan™ (Becton Dickinson). Auch zwischen den Einzelmessungen wurde die Probe nochmals gemischt, um Sedimentationsphänomene auszuschließen.

Um den Einfluß des Einfrierens und Auftauens auf den Zellgehalt des Plasmas zu untersuchen, wurden 10 Schlauchsegmente Frischplasma aus der Vollblutfraktionierung halbiert. Eine Hälfte wurde wie unter 4.2.3 beschrieben sofort präpariert und mit dem Durchflußzytometer auf ihren Zellgehalt untersucht. Die andere Hälfte des Schlauchsegmentes wurde für 24 Stunden bei -18 °C gelagert, anschließend aufgetaut, wie oben beschrieben präpariert und gemessen.

4.2.4 Auswertung der Messungen, Statistik

Zur Auswertung der Messungen wurde die Software Attractors™ verwendet.

In Zweiparameterdarstellungen können mit Hilfe dieser Software die Intensitäten ausgewählter Parameter jeden erfaßten Ereignisses (Zelle, Referenzpartikel, Debris) gegeneinander aufgetragen werden. Dabei können die während der Messung erfaßten Parameter beliebig miteinander kombiniert werden. Mit Hilfe sogenannter Attractors (ovale Populationsregionen) wird für jedes erfaßte Ereignis geprüft, welcher der zuvor definierten Populationen es angehört.

Ein Attractor für eine bestimmte Population kann in mehreren Diagrammen definiert werden. Je mehr Parameter dabei benutzt werden, umso genauer wird die Population definiert. Dies hat den Vorteil, daß Zellen, die sich in einem oder in mehreren Parametern ähneln, gut zu differen-

zieren sind, solange sie sich in mindestens einem der erfaßten Parameter voneinander unterscheiden. Monozyten- und Lymphozytenpopulation überschneiden sich beispielsweise in einer Auftragung von Vorwärtsstreuung gegen Seitwärtsstreuung, da die Zellen zum Teil eine ähnliche Größe und Granularität aufweisen. Da die Monozyten aber mit dem PE-konjugierten Monozytenmarker CD 14 markiert wurden, weisen sie ein anderes FL 2 - Fluoreszenzsignal auf als Lymphozyten (vgl. Abb. 1)

Es wurde für jedes Herstellungsverfahren die Konzentration an Leukozyten, Thrombozyten und Erythrozyten im gewonnenen Frischplasma bestimmt. Für die Berechnungen wurde das arithmetische Mittel der Zellkonzentrationen aus den Doppelbestimmungen verwendet. Die durch die Zugabe von Formaldehydlösung zum Plasma entstandene Volumenänderung wurde rechnerisch berücksichtigt.

Neben der Zellkonzentration im Plasma wurde der Zellgehalt pro Transfusionseinheit bestimmt, der sich wie folgt errechnet:

$$n_{\text{Zellen}} / \text{TE} = c_{\text{Zellen}} \cdot V$$

$n_{\text{Zellen}} / \text{TE}$	Zellzahl pro Transfusionseinheit
c_{Zellen}	durchflußzytometrisch bestimmte Zellkonzentration im Plasma
V	Gesamtvolumen des gewonnenen Plasmas

Die statistische Auswertung wurde mit SPSS for MS WINDOWS Release 6.0 vorgenommen. Zur Prüfung der Normalverteilung der Wertegruppen wurde der Kolmogorov-Smirnov-Test verwendet, die Varianzhomogenität wurde mit dem Cochran C-Test geprüft.

Normalverteilung der Werte und Homogenität der Varianzen gelten als Voraussetzungen für einfaktorielle Varianzanalysen. Ihre Anwendung ist bei Nichterfüllung dieser Voraussetzungen dennoch statthaft, wenn mehr als 15 Werte untersucht werden⁷.

Wenn die Werte nach dem Kolmogorov-Smirnov-Test nicht normalverteilt waren oder keine Varianzhomogenität bestand, wurde beim Vorliegen von weniger als 15 Werten der Mann-Whitney U -Test als nichtparametrisches Verfahren zum paarweisen Vergleich unverbundener Stichproben herangezogen.

Es wurden multivariate und univariate einfaktorielle Varianzanalysen durchgeführt. Bei Bedarf wurde als voraussetzungsfreier Test der Kruskal-Wallis-Test hinzugezogen.

Zum multiplen Mittelwertvergleich wurde der Scheffé-Test mit einem Signifikanzniveau von 0,05 verwendet.

5. Ergebnisse

5.1 Ergebnisse der Vorversuche

5.1.1 Sensitivitätsbestimmung der durchflußzytometrischen Methode

Zur Validierung der Methode bei niedrigen Leukozytenzahlen wurde eine Verdünnungsreihe aus Vollblut durchgeführt. In Abbildung 2 sind die mit dem Durchflußzytometer bestimmten Leukozytenkonzentrationen gegen die erwarteten Konzentrationen aufgetragen.

Es konnte ein linearer Zusammenhang zwischen der erwarteten und der gemessenen Leukozytenkonzentration bis in einen Bereich von 0,5 bis 1 Leukozyten pro μl ($r = 0,97$) gefunden werden.

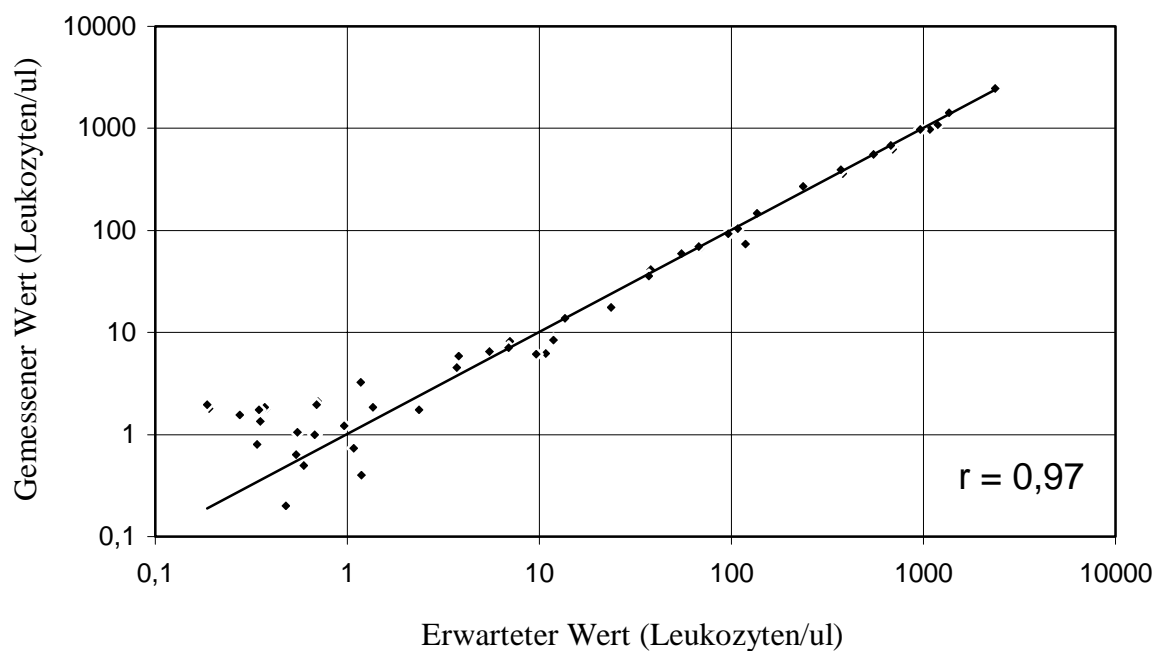


Abb. 2 Validierung der durchflußzytometrischen Methode mittels Verdünnungsreihen aus Vollblut, Vergleich zwischen erwartetem und gemessenem Wert

5.1.2 Bestimmung der Präzision der durchflußzytometrischen Methode

Um die Präzision der Messungen mit dem Durchflußzytometer einschließlich der vorhergehenden Präparationsschritte zu bestimmen, wurde Plasma aus ein und derselben Spende zehnmal, wie unter 4.2.3 beschrieben, präpariert und die Leukozytenkonzentration mit dem Durchflußzytometer bestimmt. Der Variationskoeffizient lag bei einer durchschnittlichen Leukozytenkonzentration von 0,8 Zellen pro μl bei 22,9 %.

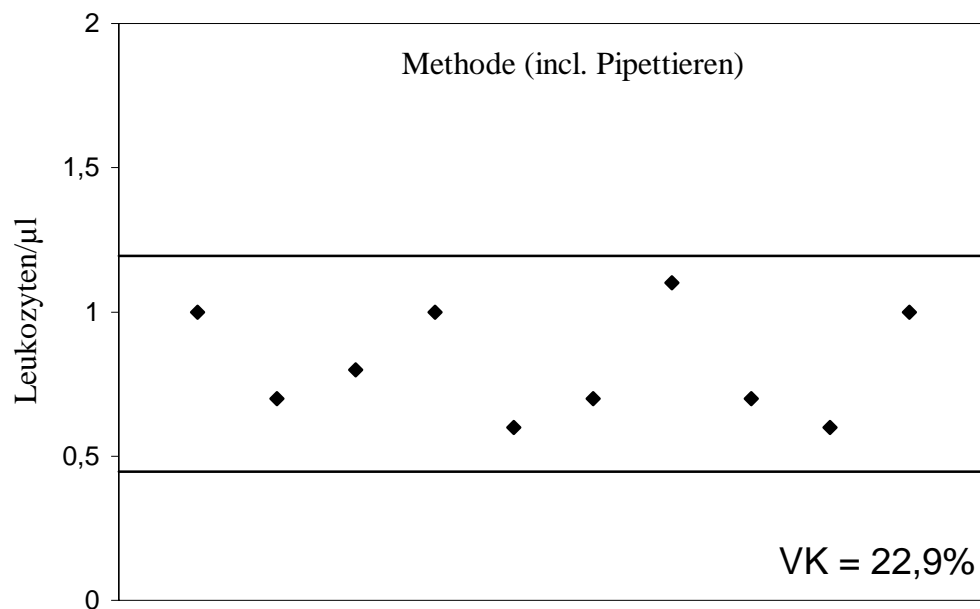


Abb. 3 Zehnmalige Präparation ein und derselben Probe

5.1.3 Vergleich mit den Ergebnissen aus der Zählung in der Nageotte-Kammer

Der Vergleich der Ergebnisse aus der Durchflußzytometrie mit den Ergebnissen der mikroskopischen Zählung in der Nageotte-Kammer ergab ebenfalls eine zufriedenstellende Relation ($r = 0,95$). In Abbildung 4 sind der Wert aus der Zählung in der Nageotte-Kammer und der Wert aus der durchflußzytometrischen Bestimmung gegeneinander aufgetragen.

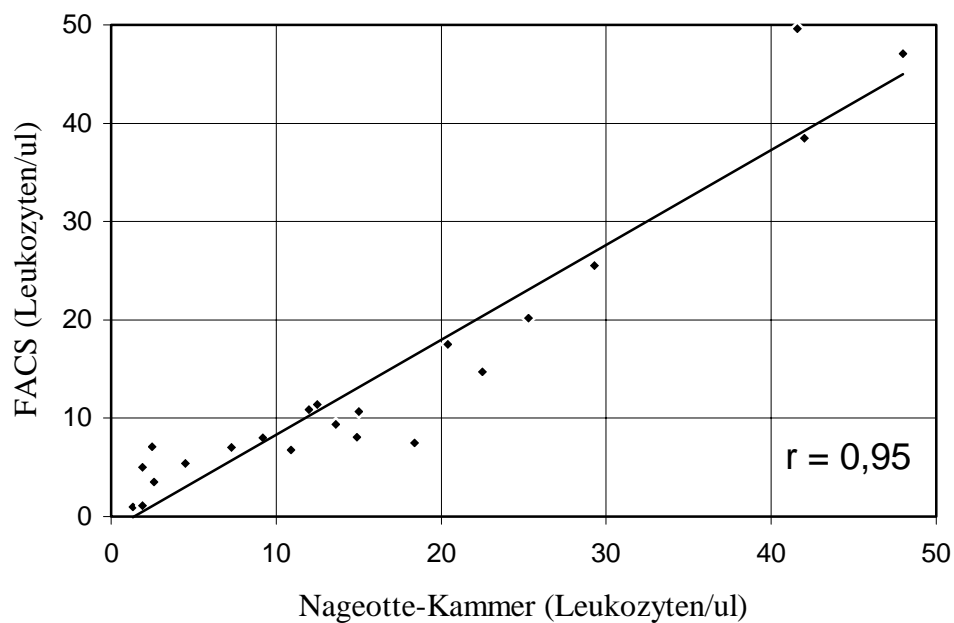


Abb. 4 Vergleich der durchflußzytometrischen Methode mit der mikroskopischen Zählung in der Nageotte-Kammer

5.2 Ergebnisse der Hauptversuche und statistische Auswertung

Die Abbildungen 5 bis 12 und Tabellen 1 bis 3 zeigen die mittlere Konzentration von Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten im Frischplasma mit Standardabweichung sowie den mittleren Zellgehalt pro Transfusionseinheit (TE) in Abhängigkeit vom Herstellungsverfahren. Als Transfusionseinheit wurde das gespendete Plasmavolumen betrachtet. Eine Besonderheit besteht bei den mittels Plasmapherese gewonnenen Frischplasmen. Hier wurden durchschnittlich 596 ml Plasma gespendet, während bei allen anderen Verfahren nur 240 bis 300 ml gewonnen wurden. Eine solche Spende wird in der Regel auf 3 Transfusionseinheiten Plasma verteilt, die damit durchschnittlich 198,7 ml umfassen.

5.2.1 Leukozyten in Frischplasma

	Mittelwert [/ μ l]	Standard- abweichung	Mittelwert [10^6 / TE*]
Vollblutfraktionierung	7,72	9,14	2,26
Plasmapherese MCS (PPP)	7,11	16,58	1,44
Thrombapherese MCS (PLP)	10,34	10,57	3,08
Thrombapherese Cobe Spectra	0,66	2,38	0,20
Thrombapherese Fresenius AS 104	0,39	0,55	0,10

Tabelle 1 Durchschnittlicher Leukozytengehalt von Frischplasma in Abhängigkeit vom Herstellungsverfahren

* TE = Transfusionseinheit

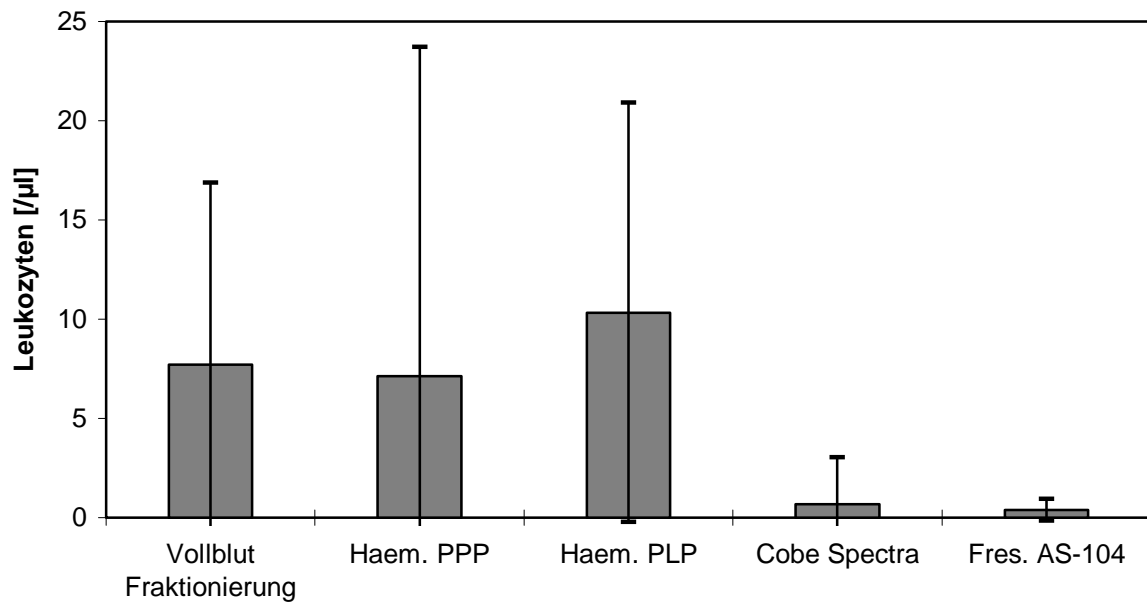


Abb. 5 Leukozytenkonzentration in Frischplasma in Abhängigkeit vom Herstellungsverfahren
Die vertikalen Linien symbolisieren die Standardabweichung.

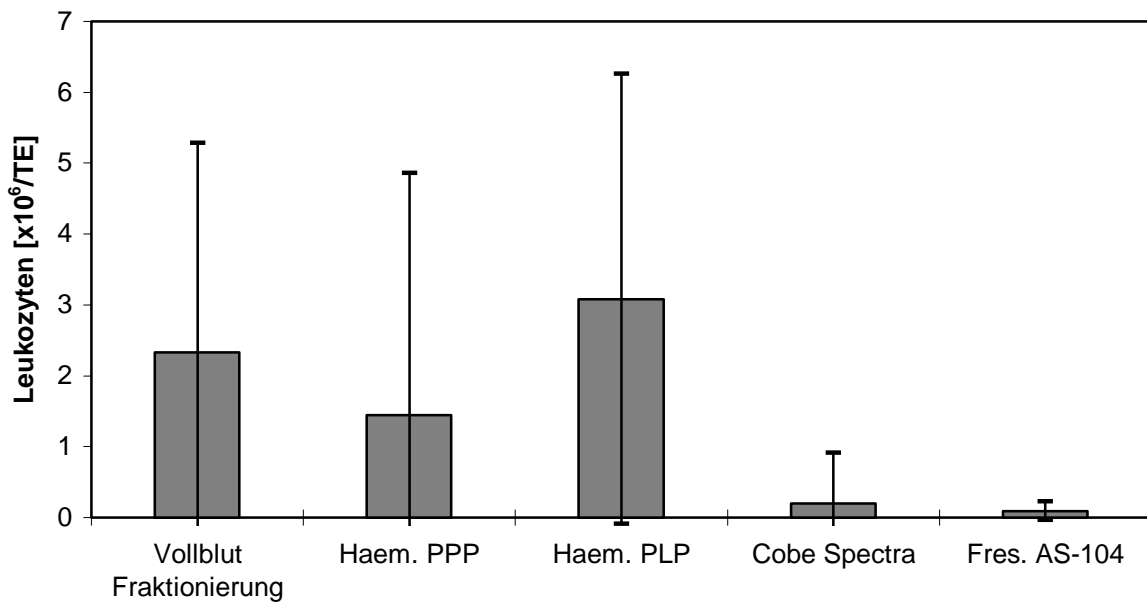


Abb. 6 Leukozytengehalt pro Transfusionseinheit Frischplasma in Abhängigkeit vom Herstellungsverfahren
Die vertikalen Linien symbolisieren die Standardabweichung.

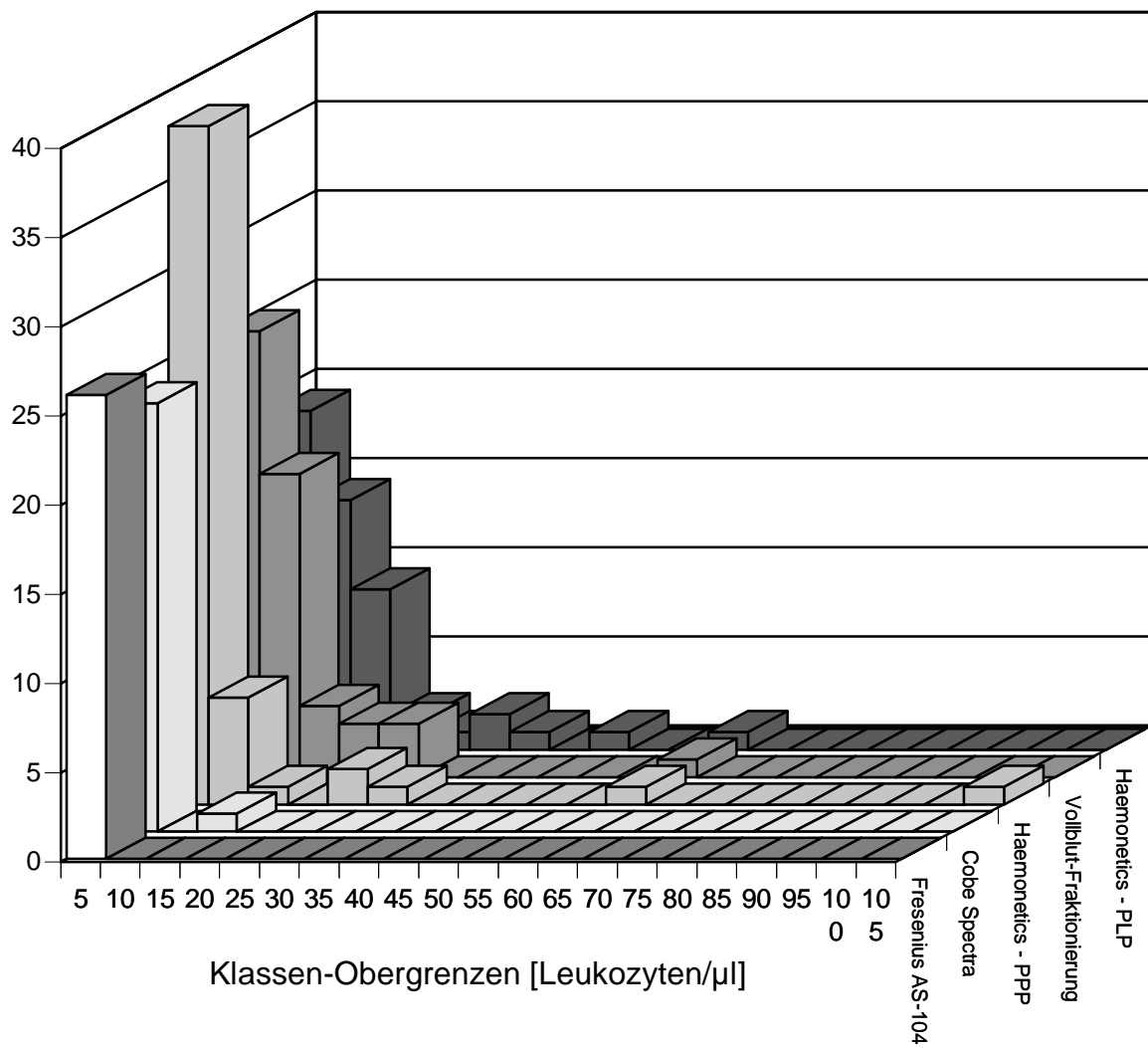


Abb. 7: Das Histogramm zeigt die Häufigkeitsverteilung der gemessenen Leukozytenkonzentrationen innerhalb des Untersuchungsmaterials.

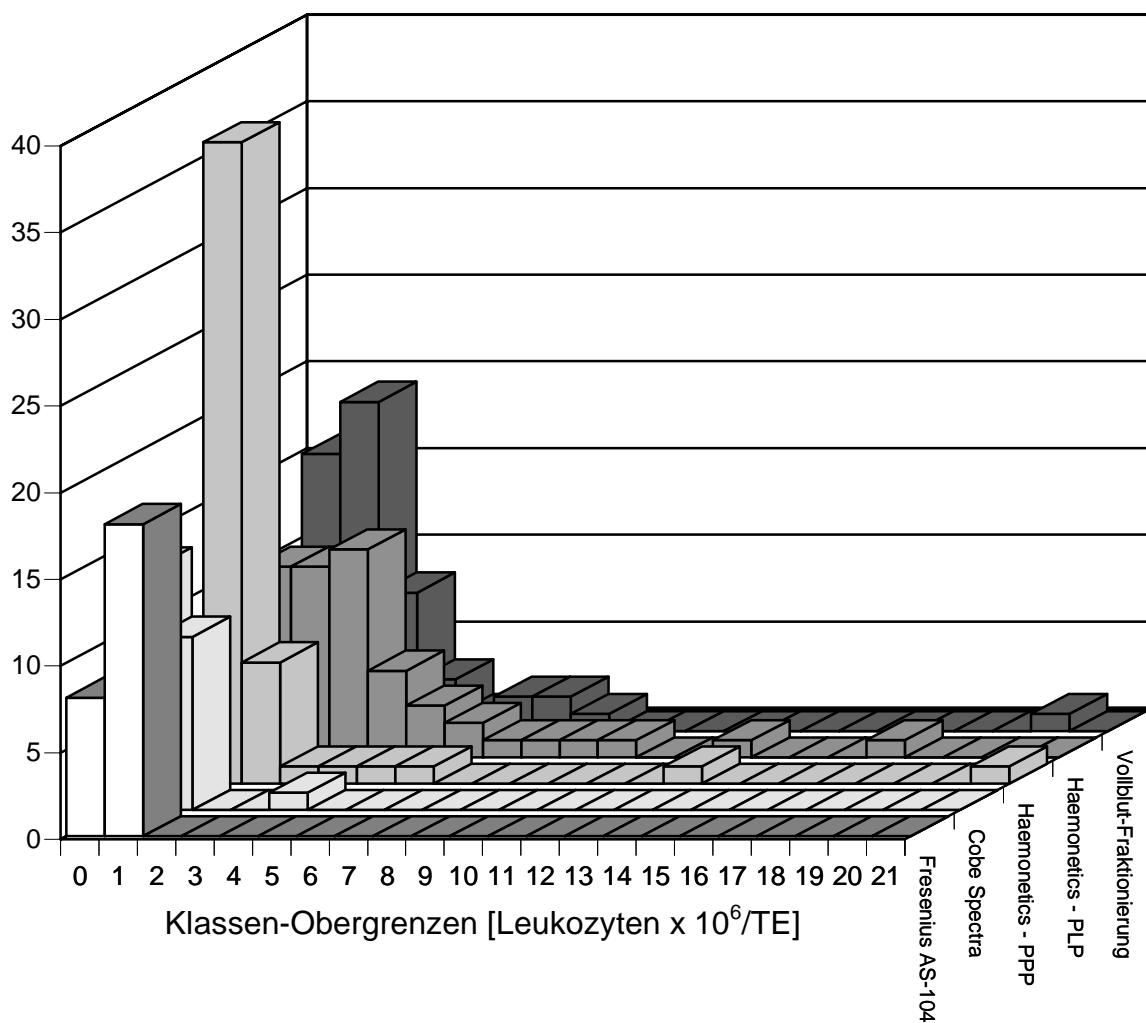


Abb. 8: Das Histogramm zeigt die Häufigkeitsverteilung des ermittelten Leukozytengehaltes pro Transfusionseinheit innerhalb des Untersuchungsmaterials.

5.2.2 Thrombozyten in Frischplasma

	Mittelwert [/ μ l]	Standard- abweichung	Mittelwert [10^6 / TE*]
Vollblutfraktionierung	13988	5752	4034
Plasmapherese MCS (PPP)	53079	24898	10471
Thrombapherese MCS (PLP)	24853	51661	7447
Thrombapherese Cobe Spectra	11736	12727	3520
Thrombapherese Fresenius AS 104	78523	84669	18672

Tabelle 2 Durchschnittlicher Thrombozytengehalt von Frischplasma in Abhängigkeit vom Herstellungsverfahren

* TE = Transfusionseinheit

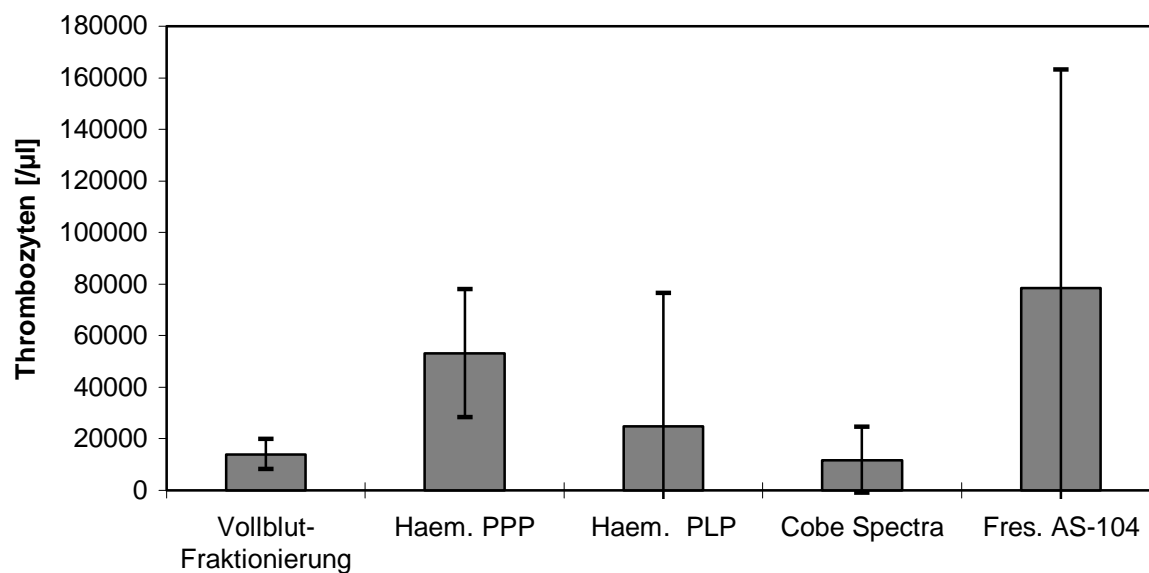


Abb.9 Thrombozytenkonzentration in Frischplasma in Abhängigkeit vom Herstellungsverfahren
Die vertikalen Linien symbolisieren die Standardabweichung.

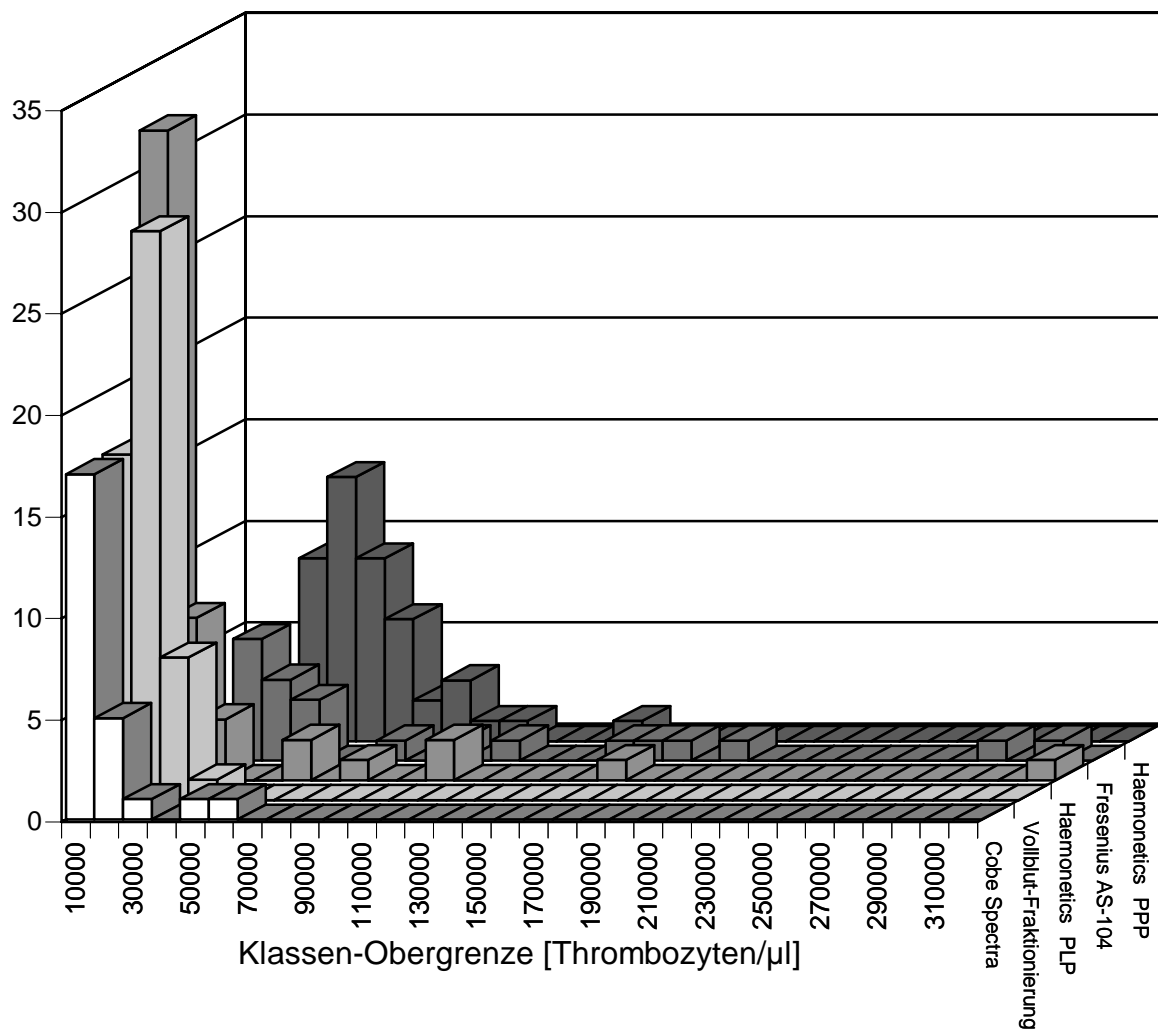


Abb. 10: Das Histogramm zeigt die Häufigkeitsverteilung der gemessenen Thrombozytenkonzentrationen innerhalb des Untersuchungsmaterials

5.2.3 Erythrozyten in Frischplasma

	Mittelwert [/ μ l]	Standard- abweichung	Mittelwert [10^6 / TE*]
Vollblutfraktionierung	197,70	230,81	57,09
Plasmapherese MCS (PPP)	231,52	197,73	45,67
Thrombapherese MCS (PLP)	199,59	237,92	58,69
Thrombapherese Cobe Spectra	192,40	188,97	57,72
Thrombapherese Fresenius AS 104	138,21	165,91	32,81

Tabelle 3 Durchschnittlicher Erythrozytengehalt von Frischplasma in Abhängigkeit vom Herstellungsverfahren

* TE = Transfusionseinheit

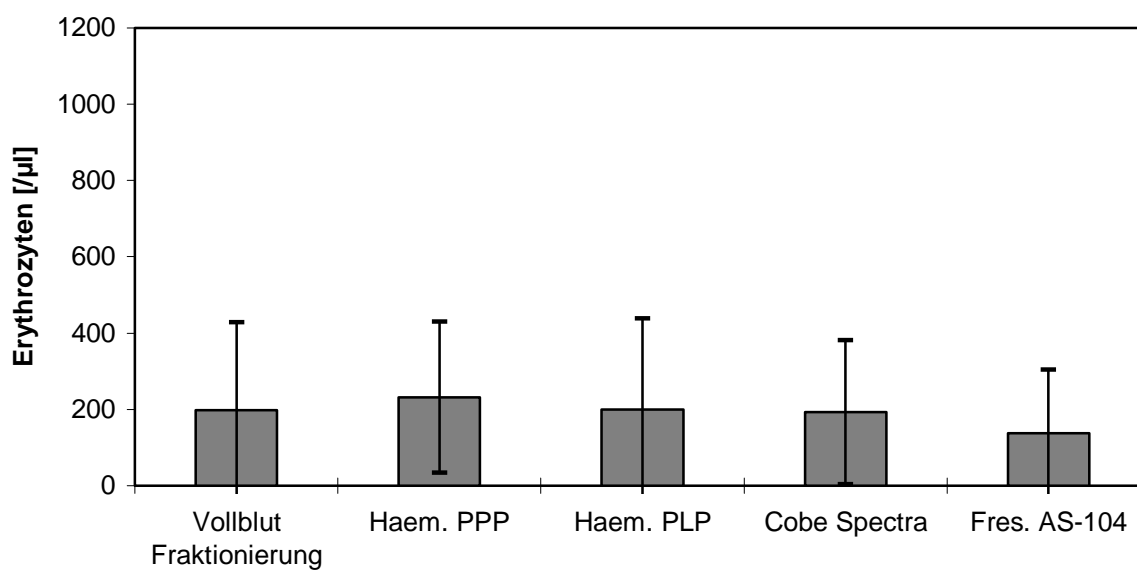


Abb. 11 Erythrozytenkonzentration in Frischplasma in Abhängigkeit vom Herstellungsverfahren
Die vertikalen Linien symbolisieren die Standardabweichung.

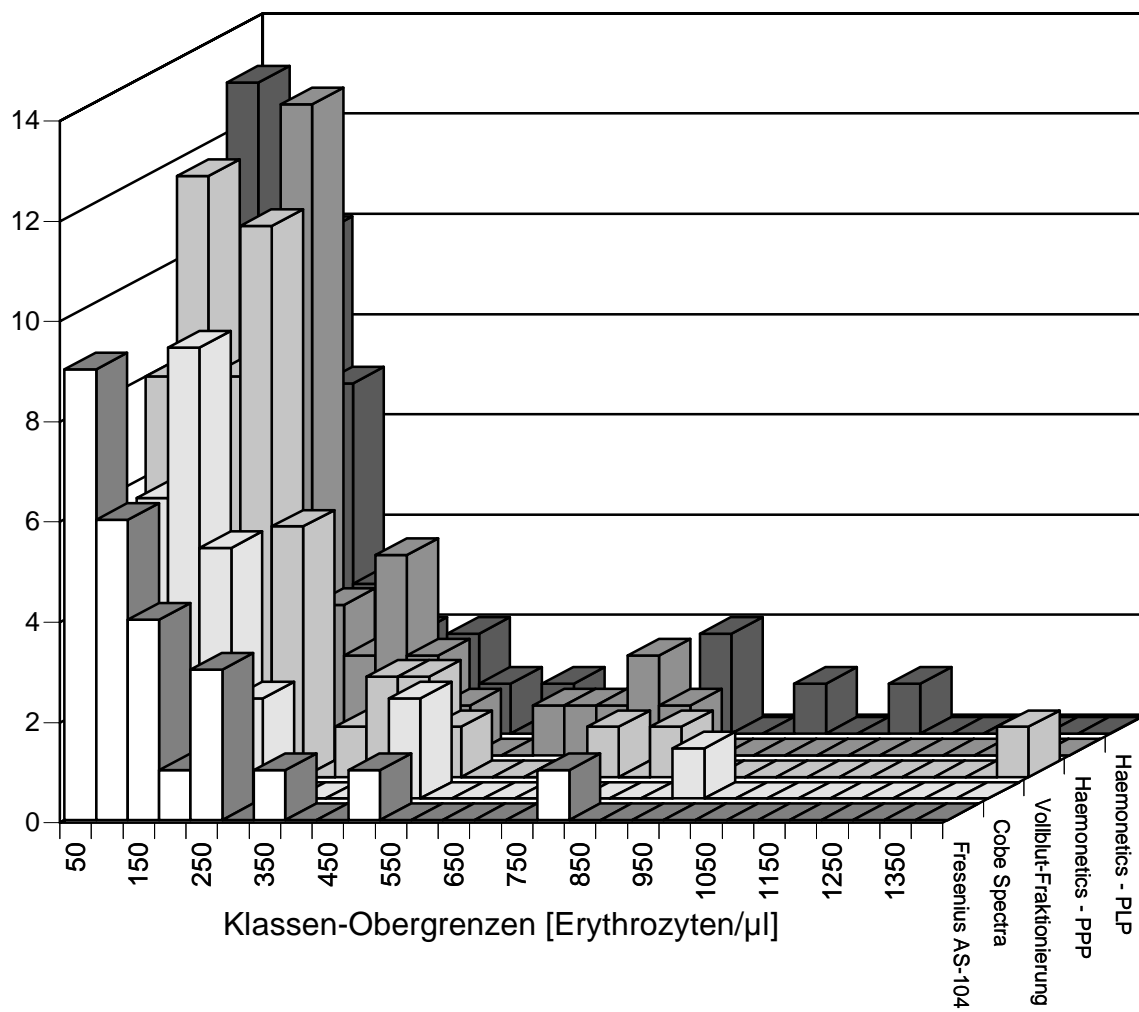


Abb. 12: Das Histogramm zeigt die Häufigkeitsverteilung der gemessenen Erythrozytenkonzentrationen innerhalb des Untersuchungsmaterials.

5.2.4 Vergleich der Verfahren mit periodischer und konstanter Trenngrenze bei Verwendung des Zellseparators Fresenius AS 104

Bei Verwendung des Zellseparators AS 104 zur Gewinnung eines Thrombozytenkonzentrates mit simultaner Herstellung einer Transfusionseinheit Frischplasma sind zwei Modifikationen des Verfahrens möglich: Die Position der Trenngrenze kann entweder konstant gehalten oder aber periodisch verschoben werden, um die Leukozytenkontamination des Konzentrates zu verringern. Es wurde untersucht, ob sich diese beiden Verfahrensweisen hinsichtlich der zellulären Kontamination des hergestellten Frischplasmas signifikant voneinander unterscheiden.

Es bestand bei Signifikanzprüfung mit dem Mann-Whitney U-Wilcoxon W-Test kein signifikanter Unterschied in der Konzentration von Erythrozyten, Leukozyten oder Thrombozyten im gewonnenen Plasma.

Bei beiden Verfahrensarten zeigten die Thrombozyten eine Normalverteilung, deshalb wurde hier zusätzlich ein t-Test durchgeführt, der einen grenzwertig signifikanten Unterschied der beiden Plasmaarten hinsichtlich des Thrombozytengehaltes ergab.

Allerdings wiesen die Thrombozytenbestimmungen eine breite Streuung auf, so daß bei der kleinen Anzahl an untersuchten Proben eine Bewertung problematisch ist.

Aufgrund dieser Ergebnisse und der relativ kleinen Fallzahlen (12 bzw. 14 Proben) wurden diese beiden Gruppen in der Auswertung unter dem Verfahren "Thrombapherese mit Fresenius AS 104" zusammengefaßt.

5.2.5 Vergleich der fünf untersuchten Herstellungsverfahren für Frischplasma

Die multivariate, einfaktorielle Varianzanalyse ergab, daß sich die fünf untersuchten Herstellungsverfahren hinsichtlich der Zellzusammensetzung des erzeugten Plasmas hochsignifikant voneinander unterscheiden. ($p < 0,001$)

Die univariate einfaktorielle Varianzanalyse für jede einzelne Zellart ergab einen hochsignifikanten Unterschied im Gehalt an Thrombozyten und Leukozyten ($p < 0,001$) im Frischplasma in Abhängigkeit vom Herstellungsverfahren. Der Erythrozytengehalt der untersuchten Plasmen unterschied sich dagegen nicht signifikant ($p = 0,5082$).

Zur Absicherung dieses Ergebnisses wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test ein voraussetzungsfreier Test hinzugefügt. Er bestätigte dieses Ergebnis (Thrombozyten und Leukozyten: $p < 0,01$, Erythrozyten: $p = 0,0628$) .

Es wurde ein multipler Mittelwertvergleich (Scheffé-Test) für jede Zellart und jedes Verfahren durchgeführt.

Die leukozytäre Kontamination von Plasma aus der Thrombapherese mit Haemonetics MCS 3p (PLP) lag signifikant über den Werten aus der Thrombapherese mit Fresenius AS 104 und COBE Spectra, unterschied sich aber nicht signifikant von der leukozytären Kontamination des Plasmas aus den beiden übrigen Verfahren.

Der Thrombozytengehalt von Plasma aus der Plasmapherese mit Haemonetics MCS und Fresenius AS 104 war signifikant größer als bei allen anderen Verfahren. Zwischen der thrombozytären Kontamination des Plasmas der beiden erstgenannten Verfahren bestand jedoch kein signifikanter Unterschied.

5.3 Veränderungen der Zellzahl durch Schockgefrieren

Abbildung 13 zeigt die prozentuale Änderung der Gehaltes an Thrombozyten, Erythrozyten und Leukozyten in Frischplasma durch Schockgefrierung. Die "Zunahme" des Gehaltes an Thrombozyten und Erythrozyten ist meß- beziehungsweise auswertungstechnisch bedingt: Es wird davon ausgegangen, daß Erythrozyten und Thrombozyten durch den Prozeß des Einfrierens und Auftauens zum Teil zerstört, zumindest aber in ihrer Membranintegrität beeinträchtigt werden. Da sowohl die Erythrozyten- als auch Thrombozytenpopulation ausschließlich über ihre Fluoreszenzeigenschaften, nicht aber über ihre Streulichteigenschaften mit Hilfe der Attractors quantifiziert wurden, wird jeder Partikel, der eine bestimmte Fluoreszenzintensität aufweist, unabhängig von seiner Größe und Granularität, diesen Populationen zugeordnet. Dabei kann es sich auch um Zellfragmente handeln. Insofern ist die Aussagekraft dieser Untersuchung für die Änderung des Thrombozyten- und Erythrozytengehaltes begrenzt.

Anders verhält es sich jedoch mit der Leukozytenpopulation. Die Abbildung 13 zeigt eine durchschnittliche Abnahme des Leukozytengehaltes um 34 %. Bei den Leukozyten erfolgt die Quantifizierung sowohl über die Fluoreszenz- als auch über die Streulichteigenschaften (vergleiche 4.2.4), so daß Partikel unterhalb einer bestimmten Größe und Granularität nicht zu

den Leukozyten gezählt werden, selbst wenn es sich um Leukozytenfragmente handelt. Es werden hier also nur weitgehend intakte Leukozyten quantifiziert.

Der Gehalt an intakten Leukozyten im Frischplasma nahm der vorliegenden Studie zufolge um durchschnittlich 34 % ab, wenn das Plasma schockgefroren und wieder aufgetaut wurde .

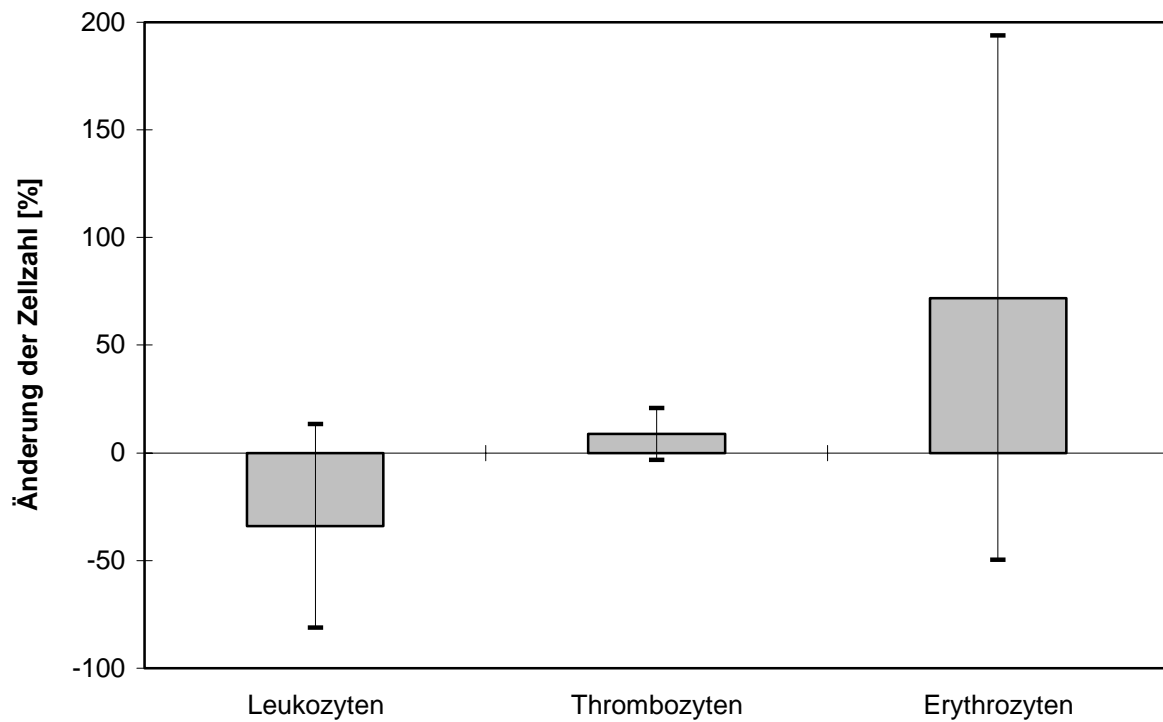


Abb. 13 Durchschnittliche Veränderung des Zellgehaltes von Frischplasma durch Schockgefrieren und Auftauen. Die vertikalen Linien symbolisieren die Standardabweichung.

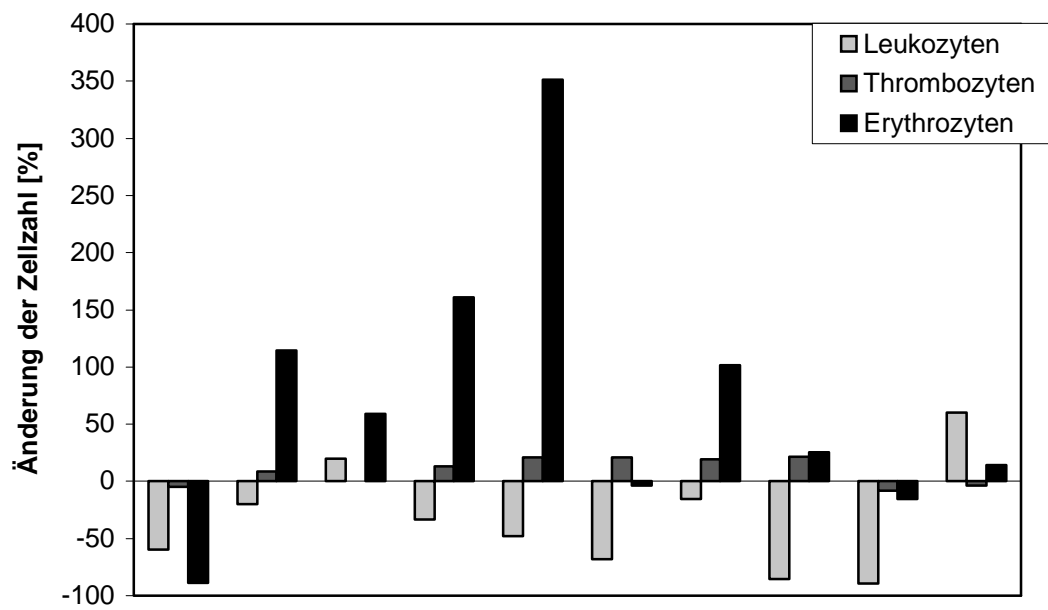


Abb. 14 Veränderung des Zellgehaltes von Frischplasma durch Schockgefrieren und Auftauen anhand der zehn untersuchten Proben

6. Diskussion

6.1 Eignung der Methode

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Durchflußzytometrie in Verbindung mit der Verwendung monoklonaler Antikörper und standardisierter, kommerziell erhältlicher Eichpartikel eine geeignete Methode zur Quantifizierung kleiner Zellkonzentrationen in Frischplasma ist.

Mit Verdünnungsreihen wurde demonstriert, daß bis zu einer Konzentration von 0,5 - 1 Leukozyten pro μl Messungen von zufriedenstellender Präzision durchführbar sind.

Mit 0,1 Leukozyten pro μl haben DZIK et al.¹⁶ eine vergleichbare Sensitivitätsgrenze für durchflußzytometrische Leukozytenbestimmungen bei Ermittlung des Probengewichtes vor und nach der Messung beschrieben. VACHULA et al.⁵², die FITC-markierte Hühnererythrozyten als Eichpartikel verwendet hatten, gaben einen linearen Zusammenhang zwischen erwartetem und gemessenem Wert bis zu einer Schwelle von 5 Leukozyten pro μl an, SHECKLER et al.⁴⁹ verwendeten eine ähnliche Technik und gaben sogar 0,001 Leukozyten pro μl als Sensitivitätsgrenze an. LUTZ³¹ fand einen ausgezeichneten Korrelationskoeffizienten zwischen erwartetem und gemessenem Wert bis zu einer Grenze von 0,3 Leukozyten pro μl . REBULLA et al.⁴⁵ gaben 0,1 Leukozyten pro μl als Sensitivitätsgrenze an.

Ein Vorteil der hier beschriebenen Methodik liegt darin, daß durch die Verwendung der kommerziell erhältlichen Eichpartikel in bekannter Konzentration die Herstellung einer Eichlösung nicht erforderlich ist.

Um präparations- und geräteabhängige Variationen für die durchflußzytometrische Methode zu ermitteln, wurde Plasma aus ein und derselben Spende zehnfach präpariert und mit dem Durchflußzytometer gemessen. Es konnte ein Variationskoeffizient von 22,9 % bei einem mittleren Zellgehalt von 0,8 Leukozyten pro μl gefunden werden.

Neben der Durchflußzytometrie ist die mikroskopische Zählung in der Nageotte-Kammer die am häufigsten beschriebene Methode zur Quantifizierung von Leukozyten in leukozytenarmen Blutprodukten. Es konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, daß die mit dem Durchflußzytometer bestimmten Zellkonzentrationen mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,95 in zufriedenstellender Weise mit den Werten aus der mikroskopischen Zählung in der Nageotte-Kammer übereinstimmten. Damit ist die Korrelation nur geringfügig schlechter als von

LUTZ et al.³¹ angegeben ($r = 0,9996$), die aber auch zeigten, daß die Zählung in der Nageotte-Kammer in einem Meßbereich von weniger als 2 Leukozyten pro μl einen Variationskoeffizienten von immerhin 40 % aufwies. Die von MASSE et al.³² beschriebene Modifikation der Methode, die im Konzentrieren der Zellen in der Hälfte des ursprünglichen Probevolumens und der Zellzählung im resuspendierten Pellet besteht, verbessert zwar die Präzision auf einen Korrelationskoeffizienten von 0,974 in einem Bereich von 0,01 bis 0,5 Leukozyten pro μl , erhöht aber gleichzeitig den Zählzeit auf 30 min für eine Probe. PRATI et al.⁴¹ beschrieben eine weitere Modifikation der Methode von MASSE³², bei der die Leukozyten auf ein Zwanzigstel des Originalvolumens konzentriert wurden. Sie gaben eine Sensitivitätsgrenze von 0,005-0,01 Leukozyten pro μl an.

Ein Vorteil der Durchflußzytometrie gegenüber der Nageotte-Kammer liegt darin, daß ein größeres Probenvolumen analysiert wird. Wie DUMONT¹⁵ in einer Übersichtsarbeit über Fehlerquellen bei der Bestimmung sehr kleiner Leukozytenzahlen darstellte, ist die Größe des Vertrauensintervalls der Ergebnisse vor allem vom prozessierten Probenvolumen abhängig. Bei der Zählung in der Nageotte-Kammer wurde eine Kammerhälfte (entspricht 50 μl) bei einer Probenverdünnung von 1:10 ausgezählt. Damit wurden 5 μl der eigentlichen Probe analysiert. Selbst beim Auszählen beider Kammerhälften können maximal 10 μl Probe analysiert werden. Das Durchflußzytometer prozessiert zirka 60 μl der Analysenlösung in der Minute. Die durchschnittliche Meßzeit bei der Zählung von Leukozyten betrug drei bis fünf Minuten. Wenn, wie bei der hier beschriebenen Präparationsart, 90 μl Plasma mit 610 μl Flüssigkeit verdünnt wurden, entspricht das einem analysierten Volumen von 25 - 40 μl der eigentlichen Probe. Damit wurde bei der durchflußzytometrischen Bestimmung der Leukozyten ein zwei- bis vierfach größeres Probenvolumen als in der Nageotte-Kammer analysiert.

Verschiedene Untersucher haben mit Hilfe von Verdünnungsreihen versucht, die Sensitivitätsgrenze der Zählmethode in der Nageotte-Kammer durch Auftragung des erwarteten Wertes gegen den ermittelten Wert anzugeben. LUTZ et al.³¹ gaben eine Schwelle von 0,3 Leukozyten pro μl an, MOROFF et al.³⁵ gaben 0,5 Leukozyten pro μl an, REBULLA et al.⁴⁵ bezeichneten 1 Leukozyten pro μl als Schwellenwert. Die letztgenannte Autorengruppe entwickelte allerdings verschiedene Präparationsmethoden für die Zählung in der Nageotte-Kammer, die auch im Konzentrationsbereich von 0,1-1 Leukozyten pro μl zufriedenstellende Ergebnisse zeigten.

Durchflußzytometrie und mikroskopische Zählung in der Nageotte-Kammer weisen somit durchaus vergleichbare Sensitivitätsgrenzen bei der Ermittlung von kleinen Leukozytenzahlen in Blutprodukten auf. Unstrittig ist, daß mikroskopische Zählmethoden einiger Erfahrung bedürfen und äußerst ermüdend sind. Bei Verwendung eines Durchflußzytometers kann ein größeres Probenvolumen analysiert werden, wodurch das Vertrauensintervall der Ergebnisse verbessert wird. Allerdings ist der materielle Aufwand für die durchflußzytometrische Bestimmung von Zellkonzentrationen bei Verwendung von monoklonalen Antikörpern und standardisierten Eichpartikeln größer als bei Verwendung der Nageotte-Kammer, so daß im Einzelfalle bei der Auswahl der Methode das Kosten-Nutzen-Verhältnis erwogen werden muß.

Die Quantifizierung fluoreszenzmarkierter Leukozyten als Gesamtpopulation mittels der hier beschriebenen Methode ist wenig problematisch. In zellreichen Proben zeigte auch die quantitative Bestimmung der Subpopulationen (Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten) plausible Ergebnisse. Je geringer allerdings der Leukozytengehalt und je größer der Gehalt an Zelltrümmern in einer Probe ist, um so größer wird die Fehlerwahrscheinlichkeit bei der Zählung der Subpopulationen. In den untersuchten Plasmaproben wurde im Fluoreszenz 1 gegen Fluoreszenz 2 - Diagramm eine konstante Debris-Population beobachtet, deren Partikel die verwendeten Antikörper CD 45 und CD 14 in gleichem Maße gebunden hatten. Sie erschwert insbesondere bei geringem Zellgehalt der Probe die Abgrenzung der Granulozytenpopulation, so daß eine sichere Unterscheidung von Granulozyten und Debris nicht möglich ist. Wenn dieser Fehler auch in zellreichen Proben nur einen unwesentlichen Prozentsatz ausmacht, steigt er doch bei zellarmen Proben, in denen zum Teil weniger als 10 Leukozytenereignisse pro Messung quantifiziert werden konnten, überproportional an. Es wurde deshalb auf die Angabe des prozentualen Anteils der Subpopulationen am Gesamtleukozytengehalt des Plasmas verzichtet. Durch das Verhältnis Leukozytenzahl/Debris wird somit die Sensitivität dieser Methode begrenzt.

Bei der Erfassung der Erythrozyten wurde in der Auftragung von Vorwärtsstreuung gegen Seitwärtsstreuung neben der normalen Erythrozytenpopulation regelmäßig eine weitere Population mit geringerer Vorwärts- und Seitwärtsstreuung beobachtet. Diese Population machte zwischen 20 und 70 % der Gesamterythrozyten aus. Es wird davon ausgegangen, daß es sich hierbei um Erythrozyten handelt, die durch die Fixierung mit Formaldehyd verändert worden sind. Da die Klassifikation der Erythrozyten jedoch ausschließlich über einen Attractor im

Fluoreszenzdiagramm erfolgte und beide Zellgruppen hinsichtlich ihrer Fluoreszenzmarkierung eine einheitliche Population bildeten, wurden sie auch als solche quantifiziert.

Anders als bei den Leukozyten werden bei der Untersuchung von Thrombozyten und Erythrozyten durch die Berechnung der Zellzahl im Fluoreszenzdiagramm (Leukozyten: FCS-SSC-Diagramm) nicht nur intakte Zellen, sondern antigenes Membranmaterial von Erythrozyten beziehungsweise Thrombozyten an sich quantifiziert, so daß die angegebenen Werte unter Umständen über der tatsächlich vorhandenen Anzahl an intakten Zellen liegen.

6.2 Zelluläre Kontamination von Frischplasma

Das in dieser Studie beschriebene Verfahren der durchflußzytometrischen Bestimmung von Zellkonzentrationen unter Verwendung kommerziell erhältlicher Referenzpartikel wurde genutzt, um die zelluläre Kontamination von Frischplasma zu bestimmen. Dabei wurde Frischplasma unterschiedlicher Herstellungsverfahren untersucht. Es konnte festgestellt werden, daß das Herstellungsverfahren durchaus einen Einfluß auf die zelluläre Zusammensetzung des Frischplasmas hat und daß sich die einzelnen Verfahren hinsichtlich des Gehaltes an Leukozyten und Thrombozyten signifikant voneinander unterscheiden, während keine signifikanten Unterschiede im Erythrozytengehalt der untersuchten Plasmen gefunden werden konnten.

Im Hinblick auf die leukozytäre und erythrozytäre Kontamination des Plasmas wurden die Forderungen der Produktmonographie des Bundesanzeigers Nr. 182 vom 27.09.1989⁹ durchweg erfüllt. Was allerdings den Gehalt an Thrombozyten betrifft, so wurde der vorgeschriebene Höchstzellgehalt von 20 000 Zellen/ μ l bei drei von fünf untersuchten Verfahren weit überschritten. Während Plasma aus der diskontinuierlichen Thrombapherese mit Haemonetics MCS mit durchschnittlich 24 853 Zellen/ μ l den Grenzwert um 24,3 % überschritt, handelte es sich mit 53 079 Zellen/ μ l bei der Plasmapherese mit Haemonetics MCS und 78 523 Zellen/ μ l bei Thrombapherese mit Fresenius AS 104 um Überschreitungen des Grenzwertes um 165 beziehungsweise 292 %. Da durch die Prozedur des Einfrierens und Auftauens ein Teil dieser Thrombozyten zerstört wird, kommt es mit der Auflösung der thrombozytären Granula zur Freisetzung von thrombogenen Substanzen und zu einer Aktivierung der plasmatischen Gerinnung.

Wird der cill-Wert (critical immunological load of leukocytes) von $1 \cdot 10^6$ Leukozyten pro Transfusionseinheit als Kriterium herangezogen, ist festzustellen, daß lediglich Plasma, das bei

kontinuierlichen Thrombaphereseverfahren als Nebenprodukt gewonnen wurde, diesen Grenzwert der Leukozytenbelastung unterschritt.

Die übrigen Verfahren überschritten den cill-Wert mit $2,26 \cdot 10^6$ Leukozyten pro Transfusions-einheit (Vollblutfraktionierung) und $3,08 \cdot 10^6$ Leukozyten pro Transfusionseinheit (diskontinuierliche Thrombapherese Haemonetics MCS, PLP) deutlich. Bei der Plasmapherese mit Haemonetics MCS (PPP) wurden durchschnittlich 592 ml Frischplasma mit einem Gesamtleukozytengehalt von $4,19 \cdot 10^6$ Zellen gewonnen. Da dieses Volumen in der Regel auf drei Empfänger verteilt wird, enthält die transfundierte Einheit an Frischplasma entsprechend nur $1,44 \cdot 10^6$ Leukozyten. Damit wird der cill-Wert, unterhalb dessen keine Alloimmunisierung mehr zu erwarten ist, jedoch immer noch überschritten.

Alloimmunisierungen durch Frischplasma sind bisher nicht beschrieben worden. Allerdings beschrieb SNIECINSKI⁵⁰ für Patienten, die weniger als $6 \cdot 10^6$ Leukozyten pro Transfusions-einheit eines Thrombozytenkonzentrates erhalten hatten, noch eine 15%ige Inzidenz von Alloimmunisierungen. Auch VAN MARWIJK KOOY et al.⁵³ beobachteten bei Patienten, die Thrombozytenkonzentrate mit weniger als $5 \cdot 10^6$ Leukozyten pro Transfusionseinheit erhalten hatten noch in 7 % der Fälle Alloimmunisierungen.

Auch die Übertragung von Cytomegalieviren durch Frischplasma ist bisher kaum gezielt untersucht worden. In einer Arbeit von BOWDEN et al.⁸ wurde von fünf Patienten, die zwischen 2 und 10 Einheiten Frischplasma erhalten hatten, keiner mit CMV infiziert. Die Autoren untersuchten 21 Patienten mit Plasmaaustausch vor einer Knochenmarkstransplantation, die neben CMV-negativen Thrombozytenkonzentraten auch ungescreentes Plasma erhalten hatten. Keiner der Patienten erlitt eine CMV-Infektion. BOWDEN ging davon aus, daß Frischplasma zu wenig Leukozyten enthält, um eine CMV-Übertragung zu verursachen, und daß die Leukozyten überdies durch das Einfrieren zerstört würden.

Die in dieser Studie ermittelten Leukozytenkonzentrationen in Frischplasma sollten jedoch im Zusammenhang mit den teilweise erheblichen Überschreitungen des cill-Wertes Anlaß zu der Überlegung geben, Frischplasma aus bestimmten Herstellungsverfahren zumindest für Empfänger mit einem erhöhten Risiko für Alloimmunisierungen zu filtrieren oder aber Plasma aus der Herstellung mit in-line-Filtration des fraktionierten Vollblutes zu verwenden. Als Risikoempfänger sind in diesem Zusammenhang potentiell multitransfundierte Patienten und Patienten mit hämatologischen und onkologischen Erkrankungen zu betrachten.

6.3 Ergebnisse anderer Untersucher

Die bisher vorliegenden Studien zur zellulären Kontamination von Frischplasma liefern sehr unterschiedliche Daten. So fanden WIEDING et al.⁵⁸ in Plasma aus der Vollblutfraktionierung durchschnittlich 125 Leukozyten/ μl durch Auszählen der Zellen nach Anfärbung mit Acridinorange. MOOG et al.³⁴ untersuchten Frischplasma, das bei der diskontinuierlichen Thrombapherese mit dem Zellseparator A 201 (Baxter) gewonnen wurde. Sie zählten die enthaltenen Zellen in einer Neubauer-Kammer aus und fanden durchschnittlich 28 Leukozyten, 4 Erythrozyten und 2200 Thrombozyten pro μl Plasma. KRETSCHMER et al.²⁸ zählten nach einer Modifikation herkömmlicher Vollblutseparatoren 11,7 bzw. $14,1 \cdot 10^3$ Thrombozyten pro μl Plasma (ohne Angabe der Zähltechnik). Auch BERNVIL et al.² untersuchten Plasma aus der Vollblutfraktionierung und fanden 2 kernhaltige Zellen pro μl . Die erheblichen Differenzen zwischen diesen Ergebnissen mögen sowohl in den verschiedenen Herstellungsverfahren für Frischplasma, als auch in den verschiedenen Zähltechniken begründet sein.

6.4 Einfluß des Einfrierens und Auftauens auf den Zellgehalt von Frischplasma

In der vorliegenden Studie wurde Frischplasma vor dem Einfrieren untersucht. Da das zur Verwendung am Patienten vorgesehene Plasma zur Gewährleistung der Virussicherheit entweder virusinaktiviert oder aber bei $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ quarantänegelagert werden muß, wurde versucht, den Einfluß des Einfrierens und Auftauens auf den Zellgehalt im Plasma zu untersuchen. Es mußte jedoch festgestellt werden, daß die Durchflußzytometrie mit der hier beschriebenen Methode der Auswertung nur für den Verlust an Leukozyten durch Einfrieren und Auftauen brauchbare Ergebnisse liefern konnte. Für den Erythrozyten- und Thrombozytengehalt konnte lediglich festgestellt werden, daß ein Teil der Zellen nach dem Auftauen eine kleinere Größe und Granularität aufweist als im Frischplasma und daß die Gesamtzahl fluoreszenzmarkierter Partikel zunahm, was auf einen Zerfall von Zellen schließen läßt.

Der Gehalt an intakten Leukozyten nahm durch die Prozedur des Einfrierens und Auftauens um durchschnittlich 34 % ab. Allerdings bleiben die Membranbestandteile der Leukozyten als antigenes Material im Plasma erhalten.

6.5 Schlußfolgerungen

Frischplasmen aus verschiedenen Herstellungsverfahren unterscheiden sich hinsichtlich ihrer thrombozytären und leukozytären Kontamination. Nur eines der untersuchten Verfahren lieferte Frischplasma, das den für die Auslösung einer Alloimmunisierung angenommenen leukozytären Kontaminationsgrad unterschritt. Wenn auch der Gehalt an intakten Leukozyten durch das Einfrieren und Auftauen des Frischplasmas abnimmt, bleiben die antigenen Membranfragmente dennoch erhalten. Es sollte daher in Betracht gezogen werden, Frischplasmakonserven für Risikopatienten gezielt nach dem Herstellungsverfahren auszuwählen, oder aber in diesen Fällen generell auf leukozytendepletierte Produkte zurückzugreifen.

7. Literaturverzeichnis

- 1 Al, E.J.M.; Visser, S.C.E.; Prins, H.K.; Pietersz, R.N.I.; Reesink, H.W.; Huisman, J.G.: A flow cytometric method for determination of white cell subpopulations in filtered red cells; *Transfusion* 31, no. 9, 1991: 835-842
- 2 Bernvil, S.S.; Abdulatiff, M.; Al.Sedairy, S.; Sasich, F.; Sheth, K.: Fresh frozen plasma contains viable progenitor cells - should we irradiate ?; *Vox. sang.* 1994; 67: 405
- 3 Blajchman, M.A.; Bardossy, L.; Carmen, R.A.; Goldman, M.; Heddle, N.M.; Singal, D.P.: An animal model of allogeneic donor platelet refractoriness: the effect of the time of leukodepletion; *Blood*, vol. 79, no. 5; 1992: 1371-1375
- 4 Bodensteiner, D.C.: A flow cytometric technique to accurately measure post-filtration white blood cell counts; *Transfusion*, vol. 27, no. 7, 1989: 651-652
- 5 Bordin, J.O.; Blajchman, M.A.: Immunosuppressive effects of allogeneic blood transfusions: implications for the patient with a malignancy; *Hematology/oncology clinics of North America*, vol.9, No. 1, Feb. 1995: 205-218
- 6 Bordin, J.O.; Heddle, N.M.; Blajchman, M.A.: Biological effects of leukocytes present in transfused cellular blood products; *Blood*, vol. 84, no. 6; 1994: 1703-1721
- 7 Bortz, J.: *Statistik für Sozialwissenschaften*; Springer-Verlag, Berlin 1993
- 8 Bowden, R.; Sayers, M.: The risk of transmitting cytomegalovirus infection by fresh frozen plasma; *Transfusion* 1990; vol. 30, no.8: 762-763
- 9 Bundesanzeiger Nr. 182 vom 27.09.1989
- 10 Claas, F.H.J.; Smeenk, R.J.T.; Schmidt, R.; van Steenbrugge, G.J.; Eernisse, J.G.: Alloimmunisation against the MHC antigens after platelet transfusions is due to the contaminating leukocytes in the platelet suspension; *Exp. Hematol.*, January 1981, vol. 9, no. 1: 84-89
- 11 Corry, R.J.; West, J.C.; Hunsicker L.G.: Effect of timing of administration and quantity of blood transfusion on cadaver renal transplant survival; *Transplantation* vol. 30, No.6, 1980: 425-428
- 12 Council of Europe: *Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components*, Strasbourg 1992
- 13 Curtsinger, L.J.; Cheadle, W.G.; Hershman, M.J.; Cost, K.; Polk, H.C.: Association of cytomegalovirus infection with increased morbidity is independent of transfusion; *The American Journal of surgery*; vol. 158; 1989: 606-611
- 14 Dooley, D.C.; Kapoor, V.; Law, P.: Detection of extremely low numbers of leukocytes in

red cell units; Blood 72; 1988; suppl. 1: 276a

- 15 Dumont, L.J.: Sampling errors and the precision associated with counting very low numbers of white cells in blood components; Transfusion 1991; vol. 31 no. 5: 428-432
- 16 Dzik, W.H.; Ragosta, A.; Cusack, W.F.: Flow-cytometric method for counting very low numbers of leukocytes in platelet products; Vox sanguinis 1990; 59: 153-159
- 17 Eisenfeld, L.; Silver, H.; McLaughlin, J.: Prevention of transfusion associated cytomegalovirus infection in neonatal patients by the removal of white cells from blood; Transfusion; vol. 32, no.3, 1992: 205-209
- 18 Fisher, M.; Chapman, J.R.; Ting, A.; Morris, P.J.: Alloimmunisation to HLA antigens following transfusion with leukocyte-poor and purified platelet suspensions; Vox sanguinis 49, 1985: 331-335
- 19 Friedman, L.I.; Sadoff, B.J.; Stromberg, R.R.: White cell counting in red cells and platelets: how few can we count ?; Transfusion 1990, vol. 30, no. 5: 387-389
- 20 Gilbert, Hudson et al.: Prevention of transfusion acquired CMV infection in infants by blood filtration to remove leukocytes, Lancet, oct.5, 1989: 1228-31
- 21 Hahn, H.; Falke, D.; Klein, P.: Medizinische Mikrobiologie; Springer 1994
- 22 Hillyer, C.D.; Emmens, R.K.; Zago-Novaretti, M.; Berkman, E.M.: Methods for the reduction of transfusion-transmitted cytomegalovirus-infection: filtration versus the use of seronegative donor units; Transfusion 1994, 34: 929-932
- 23 Hillyer, C.D.; Snyderman, D.R.; Berkman, E.M.: The risk of cytomegalovirus infection in solid organ and bone marrow recipients: transfusion of blood products; Transfusion, vol. 30, no. 6, 1990: 659-666
- 24 Hitzler, W.: Der gegenwärtige Stand der Blutfiltration - Grundlagen und klinische Bedeutung von Leukozytendepletions- und Mikroaggregatfiltern bei der Bluttransfusion; Anästhesiol. Intensivmed. Notfallmed. Schmerzther. 28, 1993: 341-351
- 25 Jensen, L.S.; Anderson, A.; Christiansen, P.M.: Postoperative infection and natural killer cell function following blood transfusion in patients undergoing elective colorectal surgery; British Journal of Surgery 1990; vol. 79: 513-519
- 26 Jensen, L.S.; Anderson, A.; Frstrup, S.C.: Comparison of one dose versus three doses of prophylactic antibiotics, and the influence of blood transfusion, on infectious complications in acute and elective colorectal surgery; British Journal of Surgery 1990; vol. 77: 513-518
- 27 Kao, K.J.; Scornik, J.C.: Accurate quantitation of the low number of white cells in white cell-depleted blood components; Transfusion 1989; 29: 774 -777

- 28 Kretschmer, V.; Tesche, U.; Richter, P.: Improvement of the separation of blood by modification of Separators Optipress and Biotrans Separator; Beitr Infusionsther, Basel, Karger 1992, vol. 30: 112-121
- 29 Lane, T; Anderson, K.; Goodnough, L.: Leukocyte reduction in blood component therapy; Annals of Internal Medicine, 1992; 117: 151-162
- 30 Lee, T.H.; Stromberg, R.R.; Heitman, J.; Tran, K.; Busch, M.P.: Quantitation of residual white cells in filtered blood components by polymerase chain reaction amplification of HLA DQ-A DNA; Transfusion 1994, vol. 34, no. 11: 987-994
- 31 Lutz, P.; Dzik, W.H.: Large volume hemocytometer chamber for accurate counting of white cells (WBCs) in WBC-reduced platelets: validation and application for quality control of WBC-reduced platelets prepared by apheresis and filtration; Transfusion 33, no. 5, 1993: 409-412
- 32 Masse, A.; Naegelen, C.; Pellegrini, N.; Segier, J.M.; Marpaux, N.; Beaujean, F.: Validation of a simple method to count very low white cell concentrations in filtered red cells or platelets; Transfusion 32, no. 6; 1992: 565-571
- 33 Miller, J.P.; Mintz, P.D.: The use of leukocyte-reduced blood components; Hematology/Oncology Clinics of North America; vol. 9; No.1, Feb. 1995: 69-90
- 34 Moog, R.; Luboldt, W.; Krützfeld, A.; Paar, D.: Thrombozytapherese mit dem Zellseparator A 201 (Baxter) - erste Daten zur Biokompatibilität; Infusionstherapie 1991; 18: 244-247
- 35 Moroff, G.; Eich, J.; Dabay, M: Validation of use of the Nageotte hemocytometer to count low levels of white cells in white cell-reduced platelet components; Transfusion 34, no. 1, 1994: 35-38
- 36 Oksanen, K.; Kekomäki, R.; Ruutu, T.; Koskimies, S.; Myllylä, G.: Prevention of alloimmunization in patients with acute leukemia by use of white cell-reduced blood components - a randomized trial; Transfusion 1991, 31: 588-594
- 37 Opelz, G.; Dharmendra, P.S. Sengar, Max R. Mickey, Terasaki, Paul I.; Effect of blood transfusions on subsequent kidney transplants; Transplantation proceedings, vol.V, No.1, 1973: 253-259
- 38 Opelz, G.; Terasaki, P.: Improvement of kidney graft survival with increased numbers of blood transfusions; The New England Journal of Medicine; Oct.12, 1978, vol. 299, no. 15: 799-803
- 40 Persijn, G.G.; Cohen, B.; Lansbergen, Q.; van Rood, J.J: Retrospective and prospective studies on the effect of blood transfusions in renal transplantation in the Netherlands; Transplantation vol. 28. No. 5, 1979: 396-400

- 41 Prati, D.; Capelli, C.; Bosoni, P.; Rebulla, P.: An improved method for white cell counting in white cell-reduced red cells; *Transfusion* 1994, vol. 34, no. 5: 453
- 43 Prince, A.M.; Smuzness, W.; Millian, S.J.: A serological study of CMV infections associated with blood transfusions, *New England Journal of Medicine* 284, 1971: 1125-1131
- 44 Radtke, H.; Lindenau, S.; Holbach, B.; Neumann, S.; Kiesewetter, H.: Durchflußzytometrische Messung der Leukozytenzahl in Vollblut und Blutkomponenten; *Infusionsther. Transfusionsmed.* 22, suppl. 1, 112-114 (1995)
- 45 Rebulla, P.; Dzik, W.H.: Multicenter evaluation of methods for counting residual white cells in leukocyte-depleted red blood cells; *Vox sanguinis* 1994; 66: 25-32
- 46 Rosemurgy, A.S.; Hart, M.B.; Murphy, C.G.: Infection after injury - Association with blood transfusion, *The American Surgeon*, vol. 58, Feb. 1992: 104-107
- 47 Saarinen, U.M.; Kekomäki, R.; Siimes, M.A.; Myllylä, G.: Effective prophylaxis against platelet refractoriness in multitransfused patients by use of leukocyte-free blood components; *Blood*, vol. 75, no. 2 1990: 512-517
- 48 Sayers, M.H.; Anderson, K.C.; Goodnough, L.T.: Reducing the risk for transfusion-transmitted cytomegalovirus infection (review); *Annals of Internal Medicine*; 1992; 116: 55-62
- 49 Sheckler, V.L.; Loken, M.R.: Routine quantitation of white cells as low as 0.001 per μl in platelet components; *Transfusion* 1993, vol. 33: 256-261
- 50 Sniecinski, I.; O'Donnell, M.R.; Nowicki, B.; Hill, L.R.: Prevention of refractoriness and HLA-alloimmunization using filtered blood products; *Blood*, vol. 71, no. 5, 1988: 1402-1407
- 51 Triulzi, D.J.; Vanek, K.; Ryan, D.H.; Blumberg, N.: A clinical and immunologic study of blood transfusion and postoperative bacterial infection in spinal surgery; *Transfusion*, vol. 32, no. 6, 1992: 517-524
- 52 Vachula, M.; Simpson, S.J.; Martinson, J.A.; Aono, F.M.; Hutchcraft, A.M.; Balma, D.L.; Van Epps, D.E.: A flow cytometric method for counting very low levels of white cells in blood and blood components; *Transfusion* 1993, vol. 33, no. 3: 262-267
- 53 Van Marwijk Kooy, M.; Van Prooijen, H.C.; Moes, M.; Bosma-Stants, I.; Akkerman, J.W.N.: Use of leukocyte-depleted platelet concentrates for the prevention of refractoriness and primary HLA alloimmunisation: a prospective, randomized trial; *Blood*, vol. 77, no. 1, 1991: 201-205
- 54 Webster, R.G.; Granoff, A. (ed.): *Encyclopedia of Virology*, vol.1; Academic Press 1994

- 55 Wenz, B.; Besso, N.: Quality control and evaluation of leukocyte-depleting filters (letter); Transfusion 1989, vol. 29, no. 2: 187
- 56 Wenz, B.; Burns, E.R.; Lee, V.; Miller, W.K.: A rare-event analysis model for quantifying white cells in white cell depleted blood; Transfusion 31, 1991: 156-159
- 57 Wester, M.R.; Prins, H.K.; Huisman, J.G.: A new radioimmunoassay for the detection of small amounts of white cells and platelets in red cell concentrates: implications for blood transfusion; Transfusion 1990; 30: 117-125
- 58 Wieding, J.U.; Vehmeyer, K.; Dittmann, J. et al.: Contamination of fresh frozen plasma with viable white cells and proliferable stem cells; Transfusion 1994, vol. 34, no. 2: 185-186

8. Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Dr. - Ing. H. Kieseewetter für die Überlassung des Dissertationsthemas.

Ganz besonders bin ich Herrn OA Dr. H. Radtke für seine freundliche und geduldige Unterstützung in allen theoretischen und praktischen Belangen, seine Hilfe bei der Auswertung der Messungen und bei der Darstellung der Ergebnisse verbunden.

Ich danke Herrn Frank Batschulat für die Erstellung der Software zur Konvertierung der gewonnenen Daten.

Weiterhin möchte ich den Mitarbeiterinnen der Hämaphereseabteilung, insbesondere Frau Sabine Neumann, für die Hilfe bei der Bereitstellung und Aufarbeitung der Proben danken.

9. Tabellarischer Lebenslauf

Name: Sabine Lindenau

geboren am 17. Juni 1971 in Magdeburg

Staatsangehörigkeit Bundesrepublik Deutschland

Nationalität: deutsch

Familienstand: ledig

Eltern: Heidemarie Lindenau, geb. Becker; Diplom-Dolmetscher und Übersetzer
Dr. med. dent. Andreas Lindenau; Fachzahnarzt für Kieferorthopädie

Schulbildung September 1978 - Juli 1986
Allgemeinbildende Polytechnische Oberschule "Hans Beimler" in Magdeburg

September 1986 - Juli 1990
Erweiterte Oberschule "Humboldt" in Magdeburg,
Ausbildung mit erweitertem altsprachlichem Unterricht

Abitur im Juli 1990

"Vorpraktikum" September 1990 - Dezember 1990
AOK Zahnarztzentrum in Magdeburg

Januar 1991 - Juli 1991
Kassenzahnärztliche Vereinigung des Landes Sachsen-Anhalt

Hochschulbildung Oktober 1991 Aufnahme des Zahnmedizinstudiums an der Medizinischen
Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin (Charité)

August 1992 Vorphysikum

März 1994 Physikum

Berlin, den 14.03.1996

10. Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, daß die vorliegende Dissertation von mir selbst und ohne unzulässige Hilfe Dritter verfaßt wurde, daß sie auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und der dargestellten methodischen Mittel angefertigt wurde.

Berlin, den 14.03. 1996